ภาวะที่เหมาะสมของภาวะการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตซีโครปิน เอ ในรีคอมบิแนนต์ *Pichia pastoris*

นางสาวปรีรญา สิงห์ไข่มุกข์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS FOR PRODUCTION OF CECROPIN A IN RECOMBINANT *Pichia pastoris*

Miss Preeraya Singkaimuk

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2015
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ภาวะที่เหมาะสมของภาวะการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตซีโครปิน เอ ในรีคอมบิแนนต์ *Pichia pastoris*
โดย	นางสาวปรีรญา สิงห์ไข่มุกข์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุกใส
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุกใส)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ยุพิน จินตภากร)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพาง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ปรีรญา สิงห์ไข่มุกข์ : ภาวะที่เหมาะสมของภาวะการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตซีโครปิน เอ ในรีคอมบิแนนต์ *Pichia pastoris* (OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS FOR PRODUCTION OF CECROPIN A IN RECOMBINANT *Pichia pastoris*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. ศรินทิพ สุกใส, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส, 125 หน้า.

ซีโครปิน เอ (cecropins A, CA) เป็นเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ที่พบในระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (immune hemolymph) ของผีเสื้อกลางคืน *Hyalophora cecropia* มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ได้ทั้งแกรมบวก และ แกรมลบ รวมถึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดเนื้องอกและต้านเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามการสกัด ซีโครปิน เอ จากผีเสื้อกลางคืนทำได้ยากเนื่องจากจะมีการปนเปื้อนของโปรตีนที่ไม่ต้องการ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการผลิตซีโครปิน เอ ในระบบของยีสต์ *P. pastoris* โดยทำการศึกษาใน ยีสต์ *P. pastoris* 3 สายพันธุ์ คือ X33 (Mut^{+}), GS115 (Mut^{+} His^{-}) และ KM71H (Mut^{S}) และหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ด้วยเทคนิค Real time PCR พบว่า ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีระดับการแสดงออกของยีน (gene expression) ที่ดีที่สุดในภาวะ ค่ากรด -ด่างที่ 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ระดับความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ รีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ที่ผลิตได้ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแยกตามความจำเพาะโดยใช้คอลัมน์ฮีสแทรบฟาสท์โฟลว์ (His trap Fast Flow) ซึ่งมีความจำเพาะกับรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ที่ต่อด้วยฮีสธิดีน จากนั้นตรวจสอบปริมาณการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงที่ภาวะดังกล่าว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *P. pastoris* สายพันธุ์ KM71H และ GS115 มีความสามารถในการผลิตซีโครปิน เอ ได้ใกล้เคียงกัน คือ 4.64 และ 4.29 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน X33 ผลิตได้เพียง 2.79 มิลลิกรัมต่อลิตร

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา 2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....
	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม ....

5672202223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS: CECROPIN A, P. PASTORIS , REALTIME PCR

PREERAYA SINGKAIMUK: OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS FOR PRODUCTION OF CECROPIN A IN RECOMBINANT *Pichia pastoris*. ADVISOR: DR. SARINTIP SOOKSAI, CO-ADVISOR: ASST. PROF. DR. KITTINAN KOMOLPIS, 125 pp.

Cecropin A (CA) is an antimicrobial peptide found in immune hemolymph of moths *Hyalophora cecropia.* It has ability to kill both Gram-positive and Gram-negative microbes and also to inhibit tumor and cancer cells. However, it is difficult to extract CA from moths because of contamination of unwanted proteins. Therefore, in this research, production of CA in yeast *Pichia pastoris* strains was investigated. Three strains of yeast *P. pastoris*: X33 (Mut^+), GS115 (Mut^+ His^-), and KM71H (Mut^S) were studied. The optimized conditions for production were revealed by Real time PCR technique that all three strains of *P. pastoris* gave high relative gene expression at pH 6, 30 degree Celsius and 0.5 percent methanol. The produced recombinant CA was purified by His trap Fast Flow affinity chromatography which is specific to the recombinant CA linked with histidine tag. Then, the concentrations of the recombinant CA produced at the optimum condition 24 h by all three strains of *P. pastoris* were quantified. The results showed that *P. pastoris* strain KM71H and GS115 could produce the similar amount of the recombinant CA at 4.64 and 4.29 mg/L, respectively, while X33 produced only at 2.79 mg/L.

Field of Study: Biotechnology	Student's Signature ....
Academic Year: 2015	Advisor's Signature ....
	Co-Advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก อาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุกใส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม จากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำปรึกษา ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการปฏิบัติหน้าที่ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดียิ่ง ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ ประธานกรรมการ จากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ ดร. ยุพิน จินตภากร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ คณาจารย์ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้าจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปไดด้วยดี ขอพระคุณเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ เจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ เจ้าหน้าที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนพี่ เพื่อน และทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือด้วยดีมาโดยตลอด

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความอุปการะเลี้ยงดู และสนับสนุนในการศึกษามาด้วยดีโดยตลอด และขอบพระคุณญาติพี่น้องในครอบครัวทุกท่านที่ให้กำลังใจที่ดีกับข้าพเจ้ามาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ .... ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญตาราง .... ฏ

สารบัญรูปภาพ .... ฒ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .... ถ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 4

1.3 วิธีดำเนินการวิจัย 4

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 5

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ 5

2.2 คุณสมบัติทั่วไปของเพปไทดตานจุลินทรีย์ 5

2.2.1 ความชอบน้ำและไม่ชอบน้ำบนโมเลกุลเดียวกัน 6

2.2.2 ขนาดความยาว 6

2.2.3 โครงสร้าง 6

2.2.3.1 โครงสร้างแอลฟาเฮลิกซ์ (α-helical) 8

2.2.3.2 โครงสร้างเป็นแผ่นบีตา (β-sheet) 8

2.2.2.3 โครงสร้างเบต้า แฮร์พิน หรือ โครงสร้างลูบ (β – hairpin or loop) 9

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

2.2.2.4 โครงสร้างเอ็กเทนเดต (Extended) 10
2.3 ขั้นตอนการทำลายเชื้อของเพปไทดตานจุลินทรีย์ 10
2.4 กลไกลการทำงานของเพปไทด์ในการแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ 11
2.4.1 รูปแบบบาร์เรล-สเตฟว์ (Barrel-stave model) 11
2.4.2 รูปแบบคาร์เปท (Carpet model) 13
2.5 แหล่งที่มาของเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ 14
2.5.1 แมลง 15
2.5.2 พืช 15
2.5.3 สัตว์เลื้อยคลาน 15
2.6 ซีโครปิน 19
2.6.1 เพปไทด์ซีโครปิน เอ 22
2.7 เทคนิคการทำรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ 26
2.8 ระบบการแสดงออกยีสต์ 28
2.8.1 เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ (Methylotrophic yeast) 29
2.8.2 *Pichia pastoris* 31
2.8.2.1 พันธุกรรมของยีสต์ที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน 32
2.8.2.1.1 สายพันธุ์ของ *P. pastoris* ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน 32
2.8.2.1.2 เวคเตอร์สำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีน 33
2.9 ปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* 35
2.9.1 อิทธิพลของค่ากรด - ด่าง 35
2.9.2 อิทธิพลของอุณหภูมิ 35
2.9.3 อิทธิพลของอัตราการเติมเมทานอล 35
2.10 เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบซีโครปิน 36

หน้า

2.10.1 เทคนิคโครมาโตกราฟี... 37

2.10.1.1 โครมาโตกราฟแบบเจลฟิลเตรชัน (Gel Filtration Chromatography).... 37

2.10.1.2 โครมาโตกราฟ แบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchanger chromatography).. 38

2.10.1.3 โครมาโตกราฟ แบบจำเพาะ (affinity chromatography)........................ 38

2.10.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)........................ 38

2.10.2.1 ความแตกต่างระหว่าง Conventional กับ Real time PCR..................... 39

2.10.2.1.2 สารเรืองแสงที่ใช้ใน Real time PCR....................................... 43

2.10.2.1.2.1 SYBR Green I.. 43

2.10.2.1.2.2 Probes based (Taqman).................................. 44

2.10.2.1.3 ลักษณะของการใช้งานใน Real time PCR 45

บทที่ 3 46

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.. 46

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี 46

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์... 46

3.1.2 สารเคมี.. 49

3.1.4 Kits... 52

3.1.5 จุลินทรีย์.. 53

3.1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ.. 53

3.1.7 พลาสมิด pPICZαA :: CAPP.. 53

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.. 54

3.2.1 สร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีนซีโครปิน เอ อยู่บนพาหะดีเอ็นเอ pPICZαA................. 54

หน้า

3.2.2 สร้างรีคอมบิแนนต์ยีสต์ *P. pastoris* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนซีโครปิน เอ 55

3.2.2.1 การเตรียมยีสต์เพื่อรับพลาสมิด 55

3.2.2.2 นำพลาสมิดเข้าสู่ยีสต์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโพเรชัน (Electroporation)........ 56

3.2.2.3 การเลี้ยง และ การหาภาวะที่เหมาะสมในการการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน ซีโครปิน เอ ใน P. pastoris........ 56

3.2.3 การตรวจสอบระดับการแสดงของยีน (gene expression) ซีโครปิน เอ ใน รีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ด้วยวิธี Real time PCR (qPCR)........ 57

3.2.3.1 วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุด Yeast RNA Kit 57

3.2.3.2 วิธีการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นซีดีเอ็นเอด้วยชุด Tetro Reverse Transcription........ 58

3.2.3.3 ปฏิกิริยา Real time PCR........ 59

3.2.4 การทำบริสุทธิ์ซีโครปิน เอ ด้วยคอลัมน์ His trap FF Affinity Chromatography ... 61

3.2.5 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic acid assay (BCA)........ 62

3.2.6 การตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการภูมิคุ้มกัน (Dot blot analysis) 62

บทที่ 4 64

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง........ 64

4.1 สร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีนซีโครปิน เอ อยู่บนพาหะดีเอ็นเอ pPICZαA 65

4.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* 68

4.2.1 การทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ด้วยคอลัมน์ His trap FF Affinity Chromatography 87

4.2.2 การตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการภูมิคุ้มกัน (Dot blot analysis) 89

4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic acid assay (BCA)........ 91

บทที่ 5 93

หน้า

สรุปผลการทดลอง....................93

รายการอ้างอิง....................95

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ....................106

ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมสารละลายเคมี....................111

ภาคผนวก ค ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ....................116

ภาคผนวก ง....................120

การวิเคราะห์ซีโครปิน เอ มาตรฐานด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซีส....................120

ภาคผนวก จ....................122

การเตรียมโปรตีนมาตรฐานเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน....................122

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์....................125

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 โครงสร้างแบบต่างๆ ของเพปไทด์ที่ประจุส่วนมากเป็นบวก.. 7

ตารางที่ 2.2 กลไลการเกิดรูพรุนของเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ 14

ตารางที่ 2.3 แหล่งที่มาของเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ 14

ตารางที่ 2.4 ลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างแบบเกลียวแอลฟา 16

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของสารละลาย Tetro Reverse Transcription 59

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ใน Real time PCR.. 60

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของสารละลายใน Real time PCR.. 61

ตารางที่ 4.1 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์.. 74

ตารางที่ 4.2 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5เปอร์เซ็นต์ 75

ตารางที่ 4.3 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญใน อาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5เปอร์เซ็นต์ 76

ตารางที่ 4.4 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญใน อาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5เปอร์เซ็นต์ 77

ตารางที่ 4.5 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญใน อาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ 78

ตารางที่ 4.6 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญใน อาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ 79

ตารางที่ 4.7 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญใน อาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ 80

ตารางที่ 4.8 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญใน อาหาร BMMY ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ มีค่ากรด - ด่างที่ 6 81

ตารางที่ 4.9 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ มีค่ากรด - ด่างที่ 6 82

ตารางที่ 4.10 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ มีค่ากรด - ด่างที่ 6 83

ตารางที่ 4.11 ปริมาณรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ 91

ตารางที่ ก-1 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 109

ตารางที่ ค-1 การวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอของรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่แปรผันค่ากรด - ด่าง 4 ถึง 7 117

ตารางที่ ค-2 การวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอของรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่แปรผัน อุณหภูมิ 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส 118

ตารางที่ ค-3 การวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอของรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่แปรผัน ระดับความเข้มของเมทานอล 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ 119

ตารางที่ จ-1 การเตรียมโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้นที่ 0 ถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 123

CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1 โครงสร้างสามมิติของเพปไทด์แมกไกนินที่พบได้จากสัตวครึ่งบกครึ่งน้ำ 8

รูปที่ 2.2 โครงสร้างสามมิติของเพปไทด์ดีเฟนซินที่พบได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม........................... 9

รูปที่ 2.3 โครงสร้างสามมิติของเพปไทด์เลคโตเฟอริน พบได้จาก น้ำนมของวัวและมนุษย์ 9

รูปที่ 2.4 โครงสร้างสามมิติของเพปไทด์อินโดลซิดินที่พบได้จากวัว 10

รูปที่ 2.5 กลไกลการทำงานของเพปไทด์ในการแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์แบบบาร์เรล-สเตฟว์ 12

รูปที่ 2.6 กลไกลการทำงานของเพปไทด์ในการแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์แบบคาร์เปท 13

รูปที่ 2.7 โครงสร้างทุติยภูมิของเพปไทด์ซีโครปิน 17

รูปที่ 2.8 การเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียต่อซีโครปิน... 21

รูปที่ 2.9 การใช้เมทานอลในกลุ่ม Methylotrophic yeast 30

รูปที่ 2.10 การจัดจำแนกยีสต์ *P. pastoris* 31

รูปที่ 2.11 แผนที่เวคเตอร์ของ pPICZα – A 34

รูปที่ 2.12 ขั้นตอนการทำ PCR แบบปกติ 41

รูปที่ 2.13 ขั้นตอนการทำ Real time PCR.. 42

รูปที่ 2.14 หลักการทำงานของสารเรืองแสง SYBR Green I.. 43

รูปที่ 2.15 หลักการทำงานของสารเรืองแสง Probes based (Taqman)....................................... 44

รูปที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของซีโครปิน เอ pPICZαA :: CAPP................ 54

รูปที่ 4.1 แผนที่ทางพันธุกรรมพลาสมิดรีคอมบิแนนต์ pPICZαA :: CA His-Tag........................... 65

รูปที่ 4.2 แผนที่ทางพันธุกรรมของพลาสมิดรีคอมบิแนนต์ pPICZαA :: CAPP His-Tag................ 66

รูปที่ 4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ ลำดับกรดอะมิโน ของซีโครปิน เอ ใน pPICZαA :: CA........... 67

รูปที่ 4.4 ผลเจลอิเลคโตรโพรีซีส (SDS-PAGE) ของส่วนใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* สายพันธุ์ ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ค่ากรด – ด่างที่ 6 อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ 68

รูปที่ 4.5 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่าง 4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ 74

รูปที่ 4.6 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5เปอร์เซ็นต์.. 75

รูปที่ 4.7 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5เปอร์เซ็นต์.. 76

รูปที่ 4.8 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5เปอร์เซ็นต์.. 77

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.9 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ 78

รูปที่ 4.10 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ 79

รูปที่ 4.11 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ 80

รูปที่ 4.12 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ค่ากรด - ด่างที่ 6 81

รูปที่ 4.13 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ค่ากรด - ด่างที่ 6 82

รูปที่ 4. 14 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ค่ากรด - ด่างที่ 6 83

รูปที่ 4.15 Melting curve ของยีนซีโครปิน เอ (CA) และ ยีนแอคติน (Actin) 84

รูปที่ 4.16 โครมาโตแกรมของ affinity chromatography ของการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ด้วยคอลัมน์ฮีสแทรบฟาสท์โฟลว์ (His trap Fast Flow) 88

รูปที่ 4.17 การตรวจวิเคราะห์ซีโครปิน เอ โดยใช้หลักการภูมิคุ้มกัน (Dot blot analysis)............ 90

รูปที่ ง - 1 ผลเจลอิเลคโตรโพรีซีส (SDS-PAGE) ของซีโครปิน เอ มาตรฐาน 121

รูปที่ จ - 1 กราฟมาตรฐานของเซรั่มอัลบูมินจากวัว.. 124

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CA	ซีโครปิน เอ (Cecropin A)
CAPP	ซีโครปิน เอ ต่อด้วยโพลีโพลีนต่อด้วยฮิทธิดีน (Cecropin A polyproline his tag)
scFv – his tag	ชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยวที่ต่อด้วยฮิทธิดีน (Single Chain Variable Fragment : scFv – his tag)
AOX	แอลกอฮอล์ออกซิเดส (Alcohol oxidase)
AOX1	ยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดส 1
AOX2	ยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดส 2
Mut^{+}	สายพันธุ์ที่ใช้เมทานอลเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (Methanol utilization plus)
Mut^{s}	สายพันธุ์ที่ใช้เมทานอลเจริญเติบโตอย่างช้า (Methanol utilization slow)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ได้รับความสนใจในการพัฒนาใช้เป็นยารักษาโรคมากกว่า 500 ชนิด ด้วยความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียไวรัส เชื้อรา และ ปรสิต ซึ่งไม่ก่อให้เกิดการต้านยาเหมือนการใช้ยาปฏิชีวนะทั่วไป ทำให้ถูกนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคแทนยาปฏิชีวนะ

เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial peptides) เป็นเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กที่มีประจุเป็นบวก โครงสร้างของเพปไทด์นั้นมีลักษณะเป็นแอมฟิพาติก (amphipathic) คือ มีทั้ง ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ในโมเลกุลเดียวกัน (Hancock and Chapple, 1999)

กลไกการทำงานของเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์เริ่มต้นด้วยการดึงดูดกัน ระหว่างขั้วบวกของเพปไทด์กับขั้วลบที่อยู่บริเวณพื้นผิวของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียแกรมลบมีกลุ่มฟอสเฟตของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่มีประจุเป็นลบดึงดูดเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ให้เข้ามาใกล้เชื้อจุลินทรีย์ และแทรกส่วนที่ไม่ชอบน้ำของสายเพปไทด์แทรกเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์และจับกับไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป็นรูหรือเสียสภาพได้ (Hancock and Chapple, 1999) เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์บางชนิดยังมีความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย ปัจจุบันมีการค้นพบเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ในธรรมชาติเป็นจำนวนมาก สิ่งมีชีวิตจำพวกแมลง ได้แก่ เพปไทด์ซีโครปิน (cecropins) ที่มาจากผีเสื้อกลางคืน (Brogden, 2005; Hultmark et al., 1982) และเพปไทด์แมกไกนิน (Magainin) ที่มาจากมอด (Baker et al., 1993) เพปไทด์เมลิททิน (Melittin)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ที่มาจากผึ้ง (Habermann, 1972) เป็นต้น เพปไทด์ที่พบในพืช ได้แก่ เพปไทด์ดีเฟนซิน (Defensins) เพปไทด์ที่พบในสัตว์เลื้อยคลาน ได้แก่ เพปไทด์คาเทลิซิดิน (Cathelicidin) ที่มาจาก งู และ จระเข้ (Van Hoek, 2014) และ เพปไทด์ที่พบในสัตว์มีเลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ เพปไทด์ฮิทตาทิน (Histatins), เพปไทด์คาเทลิซิดิน (Cathelicidin) และ เพปไทด์ดีเฟนซิน (Defensins) (De Smet and Contreras, 2005) และ เพปไทด์แอลแอล – 37 (LL-37) (Dürr et al., 2006) ที่มาจากมนุษย์ เป็นต้น

เพปไทด์ซีโครปิน (cecropins) เป็นเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ที่พบในระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (immune hemolymph) ของผีเสื้อกลางคืน *Hyalophora cecropia* มีรายงานว่า มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ได้ทั้งแกรมบวก และ แกรมลบ (Hultmark et al., 1982; Hultmark et al., 1980) นอกจากนี้ มีรายงานว่า มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดเนื้องอก (anti-tumor) และ ต้านเซลล์มะเร็ง (anti-cancer) (Hui et al., 2002; Moore et al., 1994; Shin et al., 1997; Winder et al., 1998) มีรายงานว่า การสกัดซีโครปินจากผีเสื้อกลางคืนนั้นต้องใช้หลายเทคนิค และมีขั้นตอนที่ยุ่งยากเพราะมีโปรตีนที่ปะปนกันอยู่หลายชนิดในตัวผีเสื้อ (Hultmark et al., 1982) และ ปัจจุบันซีโครปิน เอ ที่ขายทางการค้ามีราคาค่อนข้างสูง คือ 0.1 มิลลิกรัม มีราคาประมาณ 7,480 บาท (ภาคผนวก) ยังไม่รวมค่าภาษี และ ปัจจุบันมีเทคโนโลยีการตัดต่อพันธุกรรมจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งไปแสดงออกในสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า รีคอมบิแนนต์เทคโนโลยี (recombinant technology) ในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน โดยในเทคนิคนี้นั้นจำเป็นต้องอาศัยเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน โดยเซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้ คือ ยีสต์ และ *Escherichia coli* เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว พลาสมิดพาหะที่ใช้ในระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีน มีการพัฒนาให้มีความเหมาะสมมากขึ้น และมีให้เลือกใช้ได้อย่างหลากหลาย นอกจากนี้ ยีสต์ *Pichia pastoris* เป็นยีสต์ที่ได้รับความนิยมในการใช้เป็นเจ้าบ้านเพราะสามารถเจริญได้ในความ

หนาแน่นของเซลล์ที่สูง อีกทั้งยังสามารถควบคุมให้มีการแสดงออกของยีนในปริมาณสูงได้ (Çelik and Çalık, 2012) ระบบการแสดงออกของยีนโดยใช้ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของแอลกอฮอล์ออกซิเดส (*AOX* promoter) (Cregg et al., 2000) เนื่องจากยีสต์ดังกล่าวนั้นเป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ (Methylotrophic yeast) ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถใช้เมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการสร้างเซลล์และสร้างพลังงานได้ ด้วยระบบเมทาบอลิซึมที่จำเพาะเรียกว่า methanol utilization pathways (MUT) ซึ่งโปรโมเตอร์ AOX มีความแรงในการแสดงออกอย่างมากเมื่อถูกกระตุ้นในอาหารที่มีเมธานอล (Daly and Hearn, 2005; Jahic et al., 2002) นอกจากนี้ในระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนโดย *P. pastoris* ยังสามารถเลือกให้เกิดการสะสมของรีคอมบิแนนต์โปรตีนไว้ในเซลล์หรือปลดปล่อยออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อโดยอาศัยลำดับเพปไทด์ส่งออกของ α-factor (signal peptide) (Cregg et al., 2000; Jahic et al., 2003a) โดยสายพันธุ์ของยีสต์ *P. pastoris* ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีน แบ่งตามการใช้เมทานอล ประกอบด้วย สายพันธุ์ X33, GS115 และ KM71H (Invitrogen, 2005) โดยมีรายงานว่า ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพและปริมาณของรีคอมบิแนนต์โปรตีนเป็นอย่างมาก คือ ค่ากรด – ด่าง และ อุณหภูมิ ซึ่งเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความเสถียรของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ผลิตได้ (Jahic et al., 2003a; Jahic et al., 2003b) ในขณะที่ปริมาณเมทานอลมีผลต่อการเติบโตของยีสต์ *P. pastoris* และการผลิต รีคอมบิแนนต์โปรตีน (Chiruvolu et al., 1997; Couderc and Baratti, 1980; Guarna et al., 1997; Khatri and Hoffmann, 2006; Mayson et al., 2003; Swartz and Cooney, 1981; Trinh et al., 2003) ในงานวิจัยนี้จึงสนใจผลิต ซีโครปิน เอ ในระบบของยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ จากนั้นทำการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ได้แก่ ค่ากรด – ด่างที่ 4 - 7 อุณหภูมิที่ 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตซีโครปิน เอ ในรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ X33 (Mut^{+}), GS115 (Mut^{+} His^{-}) และ KM71H (Mut^{S})

1.2.2 เปรียบเทียบการผลิตซีโครปิน เอ ในรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ทั้ง 3 สายพันธุ์

1.3 วิธีดำเนินการวิจัย

1.3.1 สืบค้นข้อมูลและวางแผนการทดลอง

1.3.2 สร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีนซีโครปิน เอ อยู่บนดีเอ็นเอพาหะ pPICZ alpha A

1.3.3 สร้างสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนซีโครปิน เอ

1.3.4 หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* ได้แก่ สายพันธุ์ของยีสต์ ค่ากรด - ด่าง อุณหภูมิ และ ความเข้มข้นของเมทานอล

1.3.5 วิเคราะห์ และ สรุปผลการทดลอง เผยแพร่งานวิจัย และ เขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ยีสต์ที่สามารถผลิตซีโครปิน เอ และ ทราบถึงภาวะที่เหมาะสมในการผลิตซีโครปิน เอ ในรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ X33 (Mut^{+}), GS115 (Mut^{+} His^{-}) และ KM71H (Mut^{S})

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์

เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์เป็นเพปไทด์หรือโปรตีนเส้นสั้นๆ ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีความหลากหลายทั้งในด้านของขนาด โครงสร้าง และลำดับกรดอะมิโน ซึ่งมีรายงานว่า จัดเรียงของลำดับกรดอะมิโนนั้นมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเพปไทด์เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย มีบทบาทสำคัญในกลไกการป้องกันตัวของร่างกายต่อการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้งมนุษย์ ซึ่งในปัจจุบันนี้มีการค้นพบและมีการศึกษาเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์มากกว่า 100 ชนิด และในปีที่ผ่านนี้มีการพัฒนาเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์มาใช้เป็นยารักษาโรคมากถึง 500 ชนิด เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์มีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ เชื้อรา และ ไวรัส แม้กระทั่งแบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะ อีกด้วย (Gaspar et al., 2013; Pushpanathan et al., 2013)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2 คุณสมบัติทั่วไปของเพปไทดตานจุลินทรีย์

เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์มีคุณสมบัติและโครงสร้างที่แตกต่างกันและมีลักษณะจำเพาะซึ่งมีความสำคัญต่อกลไกการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ มีรายงานการศึกษากลไกลการทำงานของเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ที่มีลักษณะ ความจำเพาะ ต่อจุลินทรีย์ (Brogden, 2005; Brown and Hancock, 2006; Schweizer, 2009) ดังนี้

2.2.1 ความชอบน้ำและไม่ชอบน้ำบนโมเลกุลเดียวกัน

เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่มีประจุเป็นบวกและมีคุณสมบัติเป็นแบบแอมพลิฟาติก ซึ่งประจุที่แตกต่างกันนั้นจะส่งผลต่อการเข้าทำลายจุลินทรีย์ โดยกลไกการเข้าทำลายจุลินทรีย์จะอาศัยคุณสมบัติการมีประจุบวกบนโมเลกุลทำให้โมเลกุลของเพปไทด์เคลื่อนที่เข้าหาเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่แสดงประจุลบอย่างรวดเร็วตามแรงดึงดูดระหว่างประจุ และอาศัยคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำในโมเลกุลที่มาจากกรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ อะลานีน ลิวซีน ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโตเฟน ส่วนที่ไม่ชอบน้ำของเพปไทด์จะจับกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำในส่วนหางของฟอสโฟไลพิดต่าง ๆ ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งสมบัตินี้มีบทบาทสำคัญต่อเพปไทด์ในกระบวนการแทรกตัวผ่านเยื่อไขมันสองชั้นและสร้างรูในผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ (Brogden, 2005; Brown and Hancock, 2006; Schweizer, 2009)

2.2.2 ขนาดความยาว

ขนาดโมเลกุลถือเป็นลักษณะทางชีวเคมีปัจจัยแรกที่ได้มีการนำมาพิจารณาเกี่ยวกับเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากขนาดที่แตกต่างกันของเพปไทด์แต่ละชนิดมีความสัมพันธ์ต่อการทำหน้าที่หรือการออกฤทธิ์ทำลายเซลล์เป้าหมาย โดยเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กหรือเส้นสั้น ๆ จะเข้าทำลายเซลล์เป้าหมายได้ดีกว่าเพปไทด์ที่มีขนาดใหญ่หรือเพปไทด์เส้นยาวซึ่งคาดว่าขนาดโมเลกุลที่เล็กของเพปไทด์จะช่วยในกระบวนการแทรกตัวผ่านผิวเซลล์หรือเซลล์เมมเบรนของเซลล์เป้าหมาย หรือเซลล์จุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้การทำลายจุลินทรีย์ของเพปไทด์ขนาดเล็กเกิดได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง (Brogden, 2005; Brown and Hancock, 2006; Schweizer, 2009)

2.2.3 โครงสร้าง

ลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญ เนื่องจากกรดอะมิโนบางชนิดมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และทำให้เพปไทด์แต่ละชนิดนั้นมีความจำเพาะที่แตกต่างกันไป เช่น ไลซีน (K)

และ อาร์จินีน (R) ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสองนี้จะทำให้เพปไทด์มีคุณสมบัติเป็นประจุบวกบนโมเลกุล ซึ่งมีความสำคัญในการเข้าจับกับเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้แล้วยังทำให้เกิดโครงสร้างที่จำเพาะของเพปไทด์ มีรายงานว่า เพปไทด์ที่มีโครงสร้างแบบเกลียวแอลฟานั้นมีส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน ทำให้มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเพปไทด์ที่ไม่ระบุโครงสร้าง ปัจจุบันเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์สามารถแบงโดยอาศัยโครงสรางทุติยภูมิ (secondary structure) ไดเป็น 4 ชนิด ดังตารางที่ 2.1 (Pushpanathan et al., 2013)

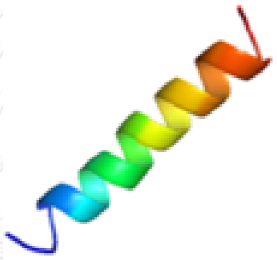
ตารางที่ 2.1 โครงสร้างแบบต่างๆ ของเพปไทด์ที่ประจุส่วนมากเป็นบวก

โครงสร้าง	ตัวอย่างเพปไทด์	เอกสารอ้างอิง
แอลฟาเฮลิกซ์ (α-helical)	เพปไทด์ซีโครปิน และ เพปไทด์แมกไกนิน	(Baker et al., 1993; Hultmark et al., 1982; Hultmark et al., 1980)
เบต้าชีท (β-sheet)	เพปไทด์ทานาทิน และ เพปไทด์ดีเฟนซิน	(Andreu and Rivas, 1998; Brogden, 2005; Oyston et al., 2009)
เบต้า แฮร์พิน (beta-hairpin)	เพปไทด์เลคโตเฟอริน	(Andreu and Rivas, 1998; Brogden, 2005; Oyston et al., 2009)
เอ็กเทนเดต (extended)	เพปไทด์อินโดลซิดิน	(Andreu and Rivas, 1998; Brogden, 2005; Oyston et al., 2009)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.2.3.1 โครงสร้างแอลฟาเฮลิกซ์ (α-helical)

เพปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็นเกลียวแอลฟา (α-helical peptides) เป็นลักษณะโครงสร้างเกลียวเวียนขวา ตัวอย่างของเพปไทด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เพปไทด์ซีโครปินเป็นเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ที่มีในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด พบครั้งแรกจากระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (immune hemolymph) ที่ได้จากผีเสื้อกลางคืน *Hyalophora cecropia* ที่ได้รับการกระตุ้นจากแบคทีเรีย พบว่าเพปไทด์ซีโครปินสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์โดยมีกลไกเข้าทำลายบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ (Hultmark et al., 1982; Hultmark et al., 1980) และ เพปไทด์แมกไกนิน ดังรูปที่ 2.1 แยกได้จากผิวหนังของสัตวครึ่งบกครึ่งน้ำ จำพวก กบ มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Baker et al., 1993) เปนต้น



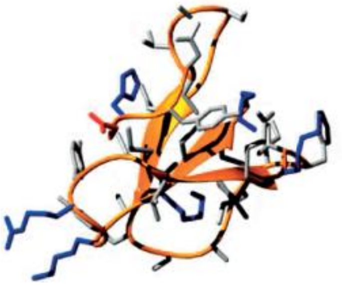
รูปที่ 2.1 โครงสร้างสามมิติของเพปไทด์แมกไกนินที่พบได้จากสัตวครึ่งบกครึ่งน้ำ

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.2.3.2 โครงสร้างเป็นแผ่นบีตา (β-sheet)

เป็นโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) อย่างน้อย 2 พันธะ ในการคงรูป ตัวอย่างของเพปไทด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เพปไทด์ดีเฟนซินชนิดต่าง ๆ เพปไทด์ดีเฟนซินมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบสืบทอดแต่กำเนิดของสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดตั้งแต่แมลง พืช สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีประจุสุทธิบนโมเลกุลเป็นประจุบวก สามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ เพื่อช่วยเพิ่มความเสถียรภายในโครงสร้างของเพปไทด์ โครงสร้างระดับตติยภูมิของเพปไทด์ดีเฟนซินของมนุษย์ แสดงดังรูปที่ 2.2 มีรายงานว่าเพปไทด์ดีเฟนซินสามารถทำลายจุลินทรีย์

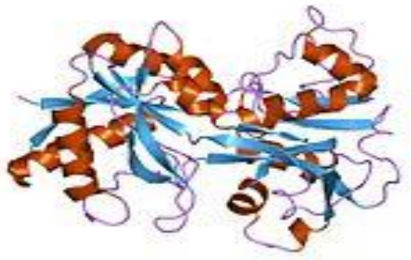
ได้ทั้งแบคทีเรียเชื้อรา ไมโครแบคทีเรีย และไวรัส โดยมีกลไกการเข้าทำลายจุลินทรีย์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ (Andreu and Rivas, 1998; Brogden, 2005; Oyston et al., 2009)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างสามมิติของเพปไทด์ดีเฟนซินที่พบได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

2.2.2.3 โครงสร้างเบต้า แฮร์พิน หรือ โครงสร้างลูป (β – hairpin or loop)

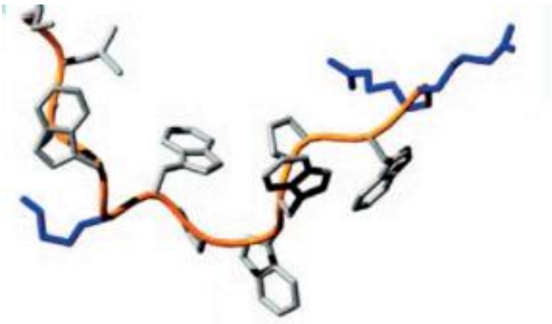
เป็นโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ในการคงรูปเพปไทด์เพียงพันธะเดียว ตัวอย่างของเพปไทด์ดังกล่าว เช่น เพปไทด์เลคโตเฟอริน แสดงดังรูปที่ 2.3 พบได้จาก น้ำนมของวัวและมนุษย์ มีรายงานว่า มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทั้งอกรมบวกและแกรมลบ การเข้าทำลายเซลล์จุลินทรีย์มี 2 แบบ คือ เพปไทด์จะเข้าจับกับไอออนเหล็ก ซึ่งเป็นธาตุที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ส่งผลให้เซลล์ตายได้ในที่สุด และ ใช้ประจุเข้าจับกับจุลินทรีย์ที่มีแกรมบวก และ ลบ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงและมีการซึมผ่านของสารภายในเซลล์และทำให้เซลล์ตายได้ในที่สุด เป็นต้น (Andreu and Rivas, 1998; Brogden, 2005; González-Chávez et al., 2009; Oyston et al., 2009)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างสามมิติของเพปไทด์เลคโตเฟอริน พบได้จาก น้ำนมของวัวและมนุษย์

2.2.2.4 โครงสร้างเอ็กเทนเดต (Extended)

เป็นโครงสร้างที่มีสายตรง ตัวอย่างของเพปไทด์ดังกล่าว เช่น เพปไทด์อินโดลซิดิน แสดงดังรูปที่ 2.4 จากวัว (Subbalakshmi and Sitaram, 1998) มีความสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด มีรายงานว่า เพปไทด์ดังกล่าวนี้ไม่ทำลายที่เยื่อหุ้มเซลล์แต่จะเข้าสู่เซลล์แล้วไปยับยั้งกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิกและโปรตีน เปนตน (Andreu and Rivas, 1998; Brogden, 2005; Oyston et al., 2009; Subbalakshmi and Sitaram, 1998)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างสามมิติของเพปไทด์อินโดลซิดินที่พบได้จากวัว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3 ขั้นตอนการทำลายเชื้อของเพปไทดตานจุลินทรีย์

การดึงดูด หรือ เหนี่ยวนำระหว่างจุลินทรีย์และเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ อาศัยแรงขั้วไฟฟ้าซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์และองคประกอบของสารบนผิวของเซลล เชน ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ของเชื้อแบคทีเรียกลุมแกรมลบหรือกรดไทโคอิค (Teichoic acid) ของเชื้อแบคทีเรียกลุมแกรมบวกนั้นมีประจุรวมเป็นลบ ในขณะที่เพปไทดตานจุลินทรีย์มีประจุเปนบวก หลังจากนั้นเกิดการเหนี่ยวนำระหว่างเซลล์แล้วโดยเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์จะมีประจุบวกทำให้สามารถแทรกตัวผ่านผนังเซลล์เข้าไปยึดเกาะกับประจุลบของฟอสโฟไลปิดในชั้นลิปิดไบเลเยอร์ของเซลล์ และแทรกเพปไทด์ด้านที่ไม่ชอบน้ำเข้าไปในชั้นเมมเบรนทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการรั่วไหลของ

สารจากภายในออกสู่ภายเซลล์ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ตายในที่สุดกลไกการทำงานของเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์เริ่มต้นด้วยการดึงดูดกัน ระหว่างขั้วบวกของเพปไทด์กับขั้วลบที่อยู่บริเวณพื้นผิวของเชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียแกรมลบมีกลุ่มฟอสเฟตของไลโปโพลีแซคคาไรด์ เพปไทด์จึงถูกดึงดูดเข้ามาใกล้เชื้อจุลินทรีย์และแทรกส่วนที่ไม่ชอบน้ำของสายเพปไทด์แทรกเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์และจับกับไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป็นรูหรือเสียสภาพได้ (Hancock and Chapple, 1999; Pushpanathan et al., 2013)

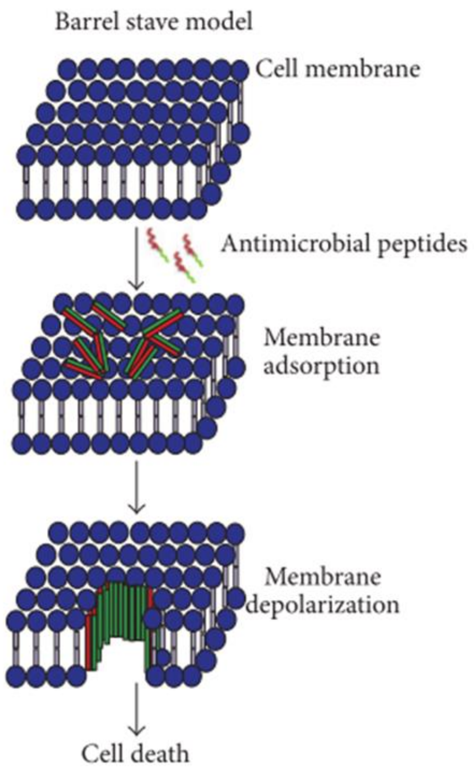
2.4 กลไกลการทำงานของเพปไทด์ในการแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์

เพปไทด์เข้าจับกับเยื่อไขมันสองชั้น จากนั้นเพปไทด์จะเข้าสู่กระบวนการแทรกตัวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ในกระบวนการนี้ความเข้มข้นของเพปไทด์ในระดับต่ำเพปไทด์จะวางตัวในแนวขนานกับเยื่อหุ้มเซลล์ และถ้ามีความเข้มข้นของเพปไทด์เพิ่มขึ้น เพปไทด์จะวางตัวตั้งฉากกับเยื่อหุ้มเซลล์ และเมื่อความเข้มข้นของเพปไทด์สูงเกินพอจะวางตัวตั้งฉากและแทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์จากการแทรกตัวนี้จะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียตายในที่สุด (Brogden, 2005) ซึ่งการเกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์นั้นจะมีลักษณะแตกต่างกันออกไปตามชนิดและโครงสร้างของเพปไทด์ทำให้เกิดแบบการจำลองของการเกิดรูรูปแบบต่างๆโดยสามารถแบ่งออกได้ 2 รูปแบบ ดังนี้

2.4.1 รูปแบบบาร์เรล-สเตฟว์ (Barrel-stave model)

รูปแบบบาร์เรล-สเตฟว์แบบจำลองนี้เกิดได้กับกลุ่มของเพปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็นแบบเกลียวแอลฟา โดยโครงสร้างนี้มีทั้งโมเลกุลที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำในสัดส่วนที่เท่ากัน (Brogden, 2005) ในระยะแรกเพปไทด์จะทำให้เกิดช่องว่างด้วยการแทรกตัวเข้าไปในชั้นในของเยื่อหุ้มเซลล์ ในลักษณะขนานกับชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ในลักษณะขนานกับชั้นฟอสโฟลิปิดไบเลเยอร์โดยเรียงตัวด้านที่ไม่ชอบ

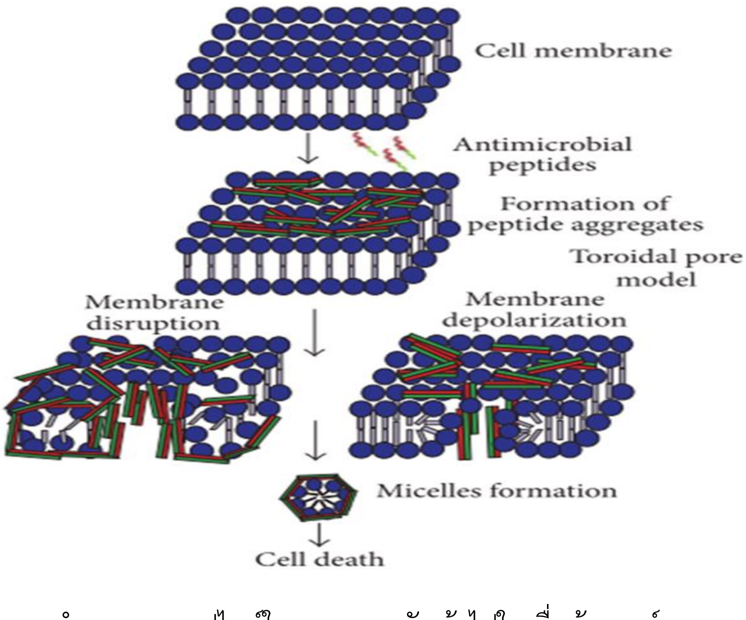
น้ำของเพปไทด์อยู่ชิดกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของฟอสโฟลิปิดไบเลเยอร์ของเยื่อหุ้มเซลล์และด้านที่ชอบน้ำของเพปไทด์จะอยู่ชิดกับช่องว่างที่อยู่ตรงกลางซึ่งมีโมเลกุลของน้ำอยู่ ไอออนและสารโมเลกุลเล็กต่าง ๆ จึงสามารถเคลื่อนออกสู่ภายนอกเซลล์ได้เมื่อส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติเชื้อจุลินทรีย์จะตายในที่สุด (Pushpanathan et al., 2013) ดังรูปที่ 2.5 แบบจำลองดังกล่าวนี้จะทำให้เกิดรูบริเวณผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ ตัวอย่างของเพปไทด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่เพปไทด์ซีทีเอ็กซ์ – เอชเอ (Ctx - Ha) ที่พบจากกบ เป็นต้น



รูปที่ 2.5 กลไกลการทำงานของเพปไทด์ในการแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์แบบบาร์เรล-สเตฟว์ (Pushpanathan et al., 2013)

2.4.2 รูปแบบคาร์เปท (Carpet model)

รูปแบบคาร์เปทมีลักษณะคล้ายกับสารชำระล้าง (Detergent) ในระดับความเข้มข้นต่ำนั้น เพปไทด์จะวางตัวในแนวขนานไปกับผิวของเยื่อหุ้มเซลล์และกระจายตัวออกไปรอบๆ ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เพื่อปกคลุมทั่วผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ในลักษณะปูพรม และเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นนั้นเพปไทด์ที่อยู่ใกล้กันจะทำให้เกิดการโค้งงอของโฟสโฟลิปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ขนกระทั่งเกิดการหลุดของเยื่อไขมันสองชั้นบางส่วนทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ จนเมื่อเกิดความเข้มข้นที่สูงพอนั้นจะเกิดรูขนาดใหญ่บนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เพปไทด์สามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ง่ายขึ้นจากนั้นของเหลวที่อยู่ภายนอกเซลล์จากนั้นเกิดการยุบตัวของเมมเบรนทำให้เซลล์หลุดออกมาภายนอก และทำให้เซลล์ของแบคทีเรียตายในที่สุด ดังรูปที่ 2.6 (Pushpanathan et al., 2013) ตัวอย่างของเพปไทด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เพปไทด์แอลแอล – 37, เพปไทด์ซีโครปิน, เพปไทด์เมทินทิน และ เพปไทด์คาอิริน เป็นต้น



รูปที่ 2.6 กลไกลการทำงานของเพปไทด์ในการแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์แบบคาร์เปท (Pushpanathan et al., 2013)

ตารางที่ 2.2 กลไลการเกิดรูพรุนของเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ (Brogden, 2005)

รูปแบบของฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์	ตัวอย่างเพปไทด์
แบบบาร์เรล-สเตฟว์	เพปไทด์อะลามิธิซิน
แบบคาร์เปท	เพปไทด์ซีโครปิน, เพปไทด์เมทินทิน และ เพปไทด์คาอิริน

จากกลไกการแทรกตัวของเพปไทด์ที่กล่าวมานั้นทำให้มีการศึกษาค้นคว้าเพปไทด์ใหม่ที่ได้จากธรรมชาติอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์นั้นมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีและยังสามารถฆ่าเชื้อได้แม้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้อีกด้วย

2.5 แหล่งที่มาของเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์

ปัจจุบันมีการค้นพบเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นในธรรมชาติจากสิ่งมีชีวิตจำพวกแมลง พืช สัตว์เลื้อยคลาน ดังตารางที่ 2.3 (Pushpanathan et al., 2013)

ตารางที่ 2.3 แหล่งที่มาของเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ (Pushpanathan et al., 2013)

แหล่งที่พบ	เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์
แมลง	เพปไทด์ซีโครปิน เอ, เพปไทด์ดีเฟนซิน และ เพปไทด์เมลิททิน
พืช	เพปไทด์ดีเฟนซิน และ เพปไทด์ไทโอนิน
สัตว์เลื้อยคลาน	เพปไทด์นิโกรซิน และ เพปไทด์เบอร์วินิน
สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	เพปไทด์ดีเฟนซิน, เพปไทด์ฮิทตาทิน และ เพปไทด์อินโดลิซิลิน

2.5.1 แมลง

แมลงเป็นสัตว์ที่มีมากกว่า 3 ใน 4 ของโลกซึ่งเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาเพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์จากสัตว์ชนิดนี้เนื่องจากมีปริมาณที่มากและยังไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์มากนักที่ผ่านมาจึงเป็นที่นิยมในการศึกษาการใช้ประโยชน์จากแมลง ในการศึกษาเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ก็เช่นกัน ซึ่งในปี 1981 ได้มีการค้นพบเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากเซลล์เม็ดเลือดและไขมันของผีเสื้อกลางคืน (*Hyalophora cecropia*) และ แมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) ที่มีความสามารถในการต้านแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* ได้อีกด้วย (Pushpanathan et al., 2013)

2.5.2 พืช

พืชเป็นสิ่งมีชีวิตที่เราสามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งธรรมชาติต่างๆ เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ที่พบในกลุ่มนี้ ได้แก่ เพปไทด์ดีเฟนซิน เปนกลุมเพปไทดตานเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งสามารถพบไดทั้งในพืช แมลง สัตวไมมีกระดูกสันหลัง และสัตวมีกระดูกสันหลัง จากงานวิจัยที่ผ่านมารายงานว่า เพปไทด์ดีเฟนซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไดทั้งในกลุมแกรมบวกและแกรมลบ (Pushpanathan et al., 2013)

2.5.3 สัตว์เลื้อยคลาน

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานว่า สัตว์เลื้อยคลานมีโปรตีนที่มีความสามารถต้านจุลินทรีย์ได้โดยพบได้จากเซลล์เม็ดเลือด และไลโซไซม์ โดยพบได้จากสัตว์ที่ออกลูกเป็นไข่บางชนิด เช่น ตะพาบ และเต่า ส่วนจระเข้พบไลโซไซม์ในสารสกัดเม็ดเลือดขาวมีความสามารถในการทำลายได้ทั้งเชื้อแบคทีเรีย, เชื้อรา และเชื้อไวรัส (Pushpanathan et al., 2013)

ในปี 2011 Riedl และคณะ ได้ทำการศึกษาการพัฒนาการใช้เพปไทด์เป็นยารักษาโรคมะเร็ง มีรายงานว่า โครงสร้างแบบแอลฟาเฮลิกซ์มีความสามารถที่จะใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง และมีการ

พัฒนาการใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง โดยใช้เพปไทด์ที่มีโครงสร้างแบบแอลฟาเฮลิกซ์นั้นร่วมกับยาเคมีบำบัด และรายงานว่า เพปไทด์ที่มีโครงสร้างแบบแอลฟาเฮลิกซ์สามารถนำมาใช้ร่วมกันกับยาเคมีบำบัดในการรักษามะเร็งและจะใช้เป็นตัวแทนยารักษาโรคมะเร็งเพื่อพัฒนาคุณสมบัติของเพปไทด์ดังกล่าวให้ดีขึ้นและลดการดื้อยาในเซลล์มะเร็ง (Riedl et al., 2011)

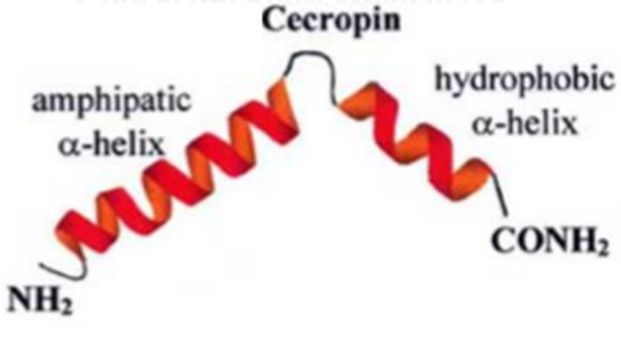
โดยในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นประจุบวกบนโมเลกุลและมีโครงสร้างแบบเกลียวแอลฟาที่พบได้ ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างแบบเกลียวแอลฟา (Pushpanathan et al., 2013)

เพปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	ขนาด
บีเอ็มเอพี – 27	GRFKRFRKKFKKLFKKLSPVIPLLHL	27
บีเอ็มเอพี – 28	GGLRSLGRKILRAWKKYGPIIVPIIRI	28
ซีโครปิน เอ	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK	37
ซีโครปิน บี	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAILS	37
แอลแอล – 37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	37
มาไกนิน	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	23
เมลิททิน	GIGVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	25

เพปไทด์บีเอ็มเอพี – 27 (BMAP-27) และ เพปไทด์บีเอ็มเอพี – 28 (BMAP-28) เป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่อยู่ในกลุ่มแคธีลิซิดินที่พบในสุกรประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 27 และ 28 ตัว ตามลำดับ ดังตารางที่ 2.4 โดยกรดอะมิโนตำแหน่ง 1 - 18 มีโครงสร้างเป็นเกลียวแอลฟาที่มีคุณสมบัติเป็นแอมพลิฟาติค และ ตำแหน่งที่ 19 ถึง 27 หรือ 28 เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ มีรายงานว่าเพปไทด์ทั้งสองชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (Pushpanathan et al., 2013)

เพปไทด์ซีโครปินเป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพกลุ่มแรกที่พบในแมลง แต่ต่อมาก็พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่นกัน เพปไทด์ในกลุ่มนี้จะประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 34-39 ตัว ดังตารางที่ 2.4 ซึ่งชนิดที่มีการศึกษามากที่สุดคือ ซีโครปิน เอ และ บี โดยเพปไทด์ทั้งสองชนิดมีโครงสร้างทุติยภูมิเป็นเกลียวแอลฟา (รูปที่ 2.7) (Holak et al., 1988; Hung et al., 1999; Pushpanathan et al., 2013) มีรายงานว่า เมื่อใช้เพปไทด์ซีโครปิน เอ ร่วมกับยาต้านมะเร็ง 2 ชนิด คือ 5 ฟลูออโรราซิล (5-fluorouracil) และ ไซตาราบีน(cytarabine) มีผลเสริมฤทธิ์กัน ในการทำลายมะเร็งเม็ดเลือดขาวกลุ่มลิมโฟซิติค (CCRF-SB human lymphoblastic leukemia cells) (Hui. L., 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาอนุพันธ์สังเคราะห์ของ ซีโครปิน บี ว่ามีความสามารถในการทำลายเซลล์ไลน์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาว (human leukemia cell line) หลายชนิดในความเข้มข้นที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ปกติและเซลล์เม็ดเลือดแดง (Srisailam et al., 2001) ซึ่งกลไกของเพปไทด์กลุ่มนี้มีรายงานว่า รูปแบบการทำลายเชื้อจุลินทรีย์แบบคาร์เปททำให้เกิดการยุบ และ รั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Efimova et al., 2014)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างทุติยภูมิของเพปไทด์ซีโครปิน (Pushpanathan et al., 2013)

เพปไทด์แอลแอล – 37 เป็นเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ในกลุ่มของเพปไทด์แคธีลิซิดินที่แยกได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ เพปไทด์ชนิดนี้มีโครงสร้างทุติยภูมิเป็นแบบเกลียวแอลฟาประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวน 37 ตัว ดังตารางที่ 2.4 มีกรดอะมิโนลิวซีน (leucine) และ ไลซีน (lycine) เป็นองค์ประกอบหลักและเป็นกรดอะมิโนส่วนสำคัญที่ทำให้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลชีพ มีรายงานว่าในการต้านเชื้อจุลชีพของเพปไทด์แอลแอล – 37 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งในกลุ่มแกรมบวก (Gram-positive bacteria) และแกรมลบ (Gram-negative bacteria) และมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อบางชนิดต่ำหรือไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เช่นกัน เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* และเชื้อยีสต์ *Candida albicans* (Dürr et al., 2006) อีกทั้งยังมีรายงานว่า เพปไทด์ดังกล่าวนี้มีความสามารถสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย (Hoskin and Ramamoorthy, 2008)

เพปไทด์มาไกนินเป็นเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ที่พบบริเวณผิวหนังของกลุ่มสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ประกอบด้วยกรดอะมิโน จำนวน 23 ตัว ดังตารางที่ 2.4 มีโครงสร้างทุติยภูมิเป็นแบบเกลียวแอลฟา ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์ทำลายทำลายเซลล์มะเร็งของมนุษย์ได้ (Baker et al., 1993)

เพปไทด์เมลิททินเป็นเพปไทด์ที่พบเป็นส่วนประกอบหลักในพิษผึ้ง (*Apis mellifera*) ประกอบด้วย กรดอะมิโนจำนวน 25 ตัว ดังตารางที่ 2.4 มีโครงสร้างเป็นเกลียวแอลฟา มีรายงานว่าเพปไทด์ชนิดนี้สามารถทำลายมะเร็งเม็ดเลือดขาว (murine L1210 leukemia cells) ในความเข้มข้นที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ไขกระดูกของหนู มีรายงานว่า เพปไทด์เมลิททินมีกลไกในการทำลายเซลล์มะเร็งแบบทำให้เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์แบบบาร์เรล-สเตฟว์ (Killion and Dunn, 1986; Sui et al., 1994)

2.6 ซีโครปิน

เพปไทด์ซีโครปินเป็นเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ในระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดถูกแยกครั้งแรกได้จากผีเสื้อกลางคืน *H. cecropia* และต่อมาก็พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเพปไทด์ซีโครปินประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 34–39 ประกอบไปด้วย เพปไทด์ซีโครปิน เอ บี ซี ดี และ พี ดังตารางที่ 2.5 (Couderc and Baratti, 1980; Hultmark et al., 1982; Lee et al., 1989; Tryselius et al., 1992) ซึ่งชนิดที่มีการศึกษามากที่สุด คือ เพปไทด์ซีโครปิน เอ และ บี โดยเพปไทด์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีโครงสร้างทุติยภูมิเป็นแบบเกลียวแอลฟาหรือแอลฟาเฮลิกซ์ ซึ่งกลไกของเพปไทด์กลุ่มนี้มีรายงานว่าโครงสร้างที่เป็นแบบเกลียวแอลฟาหรือแอลฟาเฮลิกซ์ เป็นส่วนที่จับกับโมเลกุลที่เป็นประจุลบบนเยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Pushpanathan et al., 2013) (Couderc and Baratti, 1980; Hultmark et al., 1982; Lee et al., 1989; Tryselius et al., 1992)

ตารางที่ 2.5 เพปไทด์และกรดอะมิโนในกลุ่มของซีโครปิน

เพปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	แหล่งที่พบ	ขนาด
ซีโครปิน เอ	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK	ผีเสื้อกลางคืน	37
ซีโครปิน บี	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAILS	ผีเสื้อกลางคืน	35
ซีโครปิน ซี	GWLKKLGKRIE RIGQHTRDATIQGLGIAQOAANVAATAR	แมลงหวี่	39
ซีโครปิน ดี	WNPFKELEKVGQRVRDAVISAGPAVATVAQATALAK	ผีเสื้อกลางคืน	36
ซีโครปิน พี	SWLSKTAKKLENSAKKRISEGIAIAIQGGPR	หมูป่า	31

ทั้งนี้ในครอบครัวของซีโครปิน มีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ อีกด้วย

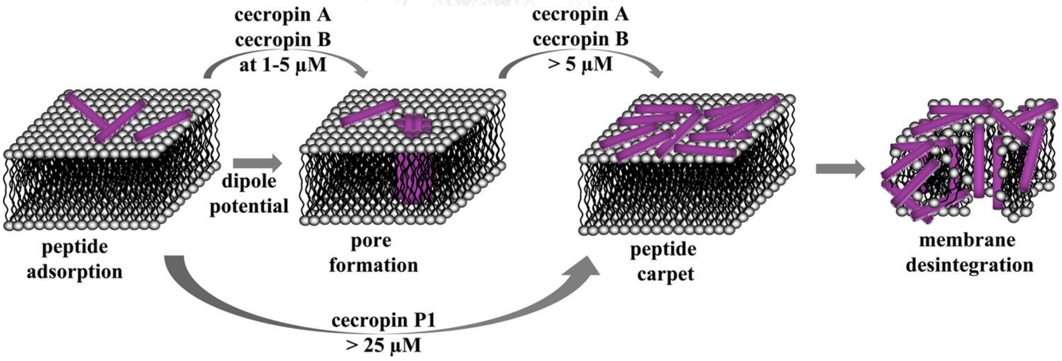
ในปี 1989 Shin และคณะ ได้มีการศึกษาความสามารถในการรวมกันของเพปไทด์ 2 ชนิด รายงานว่า เมื่อนำเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ 2 เพปไทด์มารวมกันนั้น ทำให้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้ง แกรมบวก และแกรมลบ และได้นำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ โดยได้เลือกในส่วนที่มีความสามารถในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมา นั้นก็คือ เพปไทด์ซีโครปิน เอ (กรดอะมิโนตัวที่ 1 ถึง 13) และ เพปไทด์มาไกนิน (กรดอะมิโนตัวที่ 1 ถึง 13) เพปไทด์ทั้งสองชนิดเมื่อรวมตัวกันแล้วทำให้มีสามารถในการยับยั้งมะเร็งชนิดอื่นได้อีกด้วย อีกทั้งไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติและเซลล์ข้างเคียงอีกด้วย (Shin et al., 1997)

ในปี 1997 Boman และคณะ มีการศึกษาเพปไทด์ไฮบริด (CA-ME) ที่ได้มาจาก เพปไทด์ซีโครปิน เอ (กรดอะมิโนตัวที่ 1 ถึง 8) และ เพปไทด์เมลิททิน (กรดอะมิโนตัวที่ 1 ถึง 12) รายงานว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านมาลาเรีย (Boman et al., 1989)

ในปี 2008 Suttmann และคณะ มีรายงานว่า เพปไทด์ซีโครปิน เอ และ เพปไทด์ซีโครปิน บี สามารถในการยับยั้งเซลล์เนื้องอกในกระเพาะปัสสาวะ และ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง แต่ซีโครปิน บี นั้นเป็นพิษกับเซลล์ปกติของการเกิดเนื้องอก ส่วนเพปไทด์ซีโครปิน เอ นั้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติเนื่องจากซีโครปิน เอ ไปแค่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก (Suttmann et al., 2008)

ในปี 2012 Guo และคณะ ทำการศึกษาเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ของเพปไทด์ซีโครปิน ดี ที่แสดงออกในยีสต์ *P. pastoris* รีคอมบิแนนต์ซีโครปิน ดี มีความสารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Guo et al., 2012)

ในปี 2014 Efimova และคณะ ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเมมแบรนของเยื้อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเมื่อเพปไทด์ซีโครปิน เอ บี และ พี เข้าใกล้กับเยื่อหุ้มเซลล์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ มีรายงานว่า ในระดับความเข้มข้น 1 ถึง 5 ไมโครโมลาร์ เพปไทด์ซีโครปิน เอ และ บี สามารถแทรกตัวเข้าไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้และทำให้ของเหลวภายในแบคทีเรียไหลออกมาสู่ภายนอกในที่สุด และเมื่อทำการเพิ่มระดับความเข้มข้นเป็น 5 ไมโครโมลาร์ เพปไทด์ซีโครปิน เอ และ บี จะทำการเรียงตัวและทำให้เซลล์เสียสภาพในที่สุด ส่วน เพปไทด์ซีโครปิน พี นั้นไม่สามารถแทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ในระดับความเข้มข้นดังกล่าวจะต้องเพิ่มความเข้มข้นไปถึง 25 ไมโครโมลาร์ เพปไทด์ซีโครปิน พี จะทำการเรียงตัวไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและทำให้เซลล์เสียสภาพในที่สุด (Efimova et al., 2014) ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 การเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียต่อซีโครปิน (Efimova et al., 2014)

ในปี 2015 Liu และคณะ ทำการศึกษาการยับยั้งโรคที่เกิดทางระบบสืบพันธุ์ และทางเดินหายใจของเพปไทด์ซีโครปิน ดี ในหลอดทดลอง รายงานว่าเพปไทด์ซีโครปิน ดี สามารถยับยั้งการติดเชื้อและยับยั้งการเกิดไวรัสได้ตั้งแต่ช่วงแรกๆ (Liu et al., 2015)

ในปี 2015 Zhang และคณะ ทำการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลและจากการสังเคราะห์ทางเคมีของเพปไทด์ซีโครปิน เอ จาก หนอนด้วง หรือ มวน (*Hyphantria cunea*) และฤทธิ์ต้านเชื้อ

แบคทีเรีย มีกรดอะมิโนทั้งหมด 38 หน่วย ดังนี้ RWKIFKKIERVGQNVRDG-IIKAGPAIQVLGTAKALGK จากนั้นทำการสังเคราะห์สายซีดีเอ็นเอของเพปไทด์ซีโครปิน เอ ที่ได้จากหนอนด้วง หรือ มวน (*Hyphantria cunea*) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC จากนั้นทำการตรวจสอบมวลโมเลกุลของสังเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ มีรายงานว่าเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ ซีโครปิน เอ ที่ได้จากหนอนด้วง หรือ มวน (*Hyphantria cunea*) มีลักษณะเป็นแบบแอมฟิพาติก และมีโครงสร้างเป็นแบบเกลียวแอลฟามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ K12D31 และ *Agrobacterium* EHA105 (Zhang et al., 2015)

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมานั้นจึงเป็นบทสรุปว่า ในงานวิจัยนี้จะเลือกผลิตเพปไทด์ซีโครปิน เอ เนื่องจาก ซีโครปิน เอ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ และมีการพัฒนานำซีโครปิน เอ มาใช้เป็นยาปฏิชีวนะร่วมกับเมลิทิน (cecropin-melittin) (Boman et al., 1989)

2.6.1 เพปไทด์ซีโครปิน เอ

เพปไทด์ซีโครปิน เอ ซึ่งเป็นสายเพปไทด์ที่มีขนาดของกรดอะมิโน 37 หน่วย ตารางที่ 2.4 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้ง แกรมบวก และแกรมลบ และมีการพัฒนานำ ซีโครปิน เอ มาใช้เป็นยาปฏิชีวนะร่วมกับเมลิทิน (Boman et al., 1989) และมีรายงานว่ากลไกการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ของซีโครปิน เอ นั้นเป็นรูปแบบคาร์เปท (Carpet model) และโครงสร้างยังมีลักษณะเดียวกับยาปฏิชีวนะอีกด้วย (Efimova et al., 2014) นอกจากนี้ซีโครปิน เอ ยังมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดเนื้องอก และ ต้านเซลล์มะเร็ง โดยปัจจุบันซีโครปิน เอ ที่ขายทางการค้ามีราคาค่อนข้างสูง 0.1 มิลลิกรัม มีราคาประมาณ 7,480 บาท (ภาคผนวก ซ)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ซึ่งในปี 2005 Brogden ได้ทำการศึกษากลไกลการทำงานของเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ มีรายงานว่า ซีโครปิน เอ มีลักษณะเป็นเส้นตรงเส้นตรง มีประจุบวกและมีโครงสร้างแบบเกลียว แอลฟา มีกลไกการทำงานของเพปไทด์ในการแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์แบบคาร์เปท (Brogden, 2005) ซึ่งซีโครปิน เอ นั้นมีกลไกการทำลายเชื้อจุลินทรีย์แบบคาร์เปทด้วยโดยมีการดึงดูดระหว่างขั้วบวกของซีโครปิน เอ และขั้วลบของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียจากนั้นซีโครปิน เอ จะเรียงตัวคล้ายการปูพรมไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเรียงตัวด้านที่มีประจุบวกของซีโครปิน เอ อยู่ชิดกับเยื่อหุ้มเซลล์และตัวด้านที่ไม่ชอบน้ำของเพปไทด์ออกสู่ของเหลวที่อยู่ภายนอกเซลล์จากนั้นเกิดการยุบตัวของเมมเบรนทำให้เซลล์หลุดอกมาภายนอก (Brogden, 2005)

โดยในปี 2006 Jin และคณะ ได้ทำการศึกษาการแสดงออกและศึกษาลักษณะของยีนซีโครปินจากแมลงวัน ในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *P. pastoris* โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาระหว่างซีโครปิน (Mdcec) และ ซีโครปินที่ต่อด้วยฮิทธิดีน (6His-tagged Mdcec) โดยนำยีนซีโครปินจากห้องสมุดยีน (GenBank) ที่ได้จากแมลงวันบ้าน *Musca domestica* และโคลนยีนเข้าสู่เวคเตอร์ pPICZαA และทำการศึกษาการแสดงออกในเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ *P. pastoris* ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตซีโครปิน โดยได้ศึกษาความเข้มข้นของเมทานอล 0.1, 0.5, 0.75, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด - ด่าง 3, 4, 5, 6 และ 7 ที่มีผลต่อการผลิตซีโครปิน มีรายงานว่า ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตซีโครปิน คือ ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 1 เปอร์เซ็นต์ และค่ากรด - ด่างที่ 6 หลังจากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อและเก็บตัวอย่างไปทำการบริสุทธิ์โดยซีโครปินที่ไม่ได้ต่อด้วยฮิทธิดีนใช้แคทไอออนคอลัมน์ มีรายงานว่าสามารถผลิตโปรตีนได้ 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนซีโครปินที่ต่อด้วยฮิทธิดีนทำการบริสุทธิ์ด้วยนิกเกิลคอลัมน์ รายงานว่า ได้ปริมาณโปรตีน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการตรวจสอบคุณสมบัติของซีโครปิน และ ซีโครปินที่ต่อด้วยฮิทธิดีน รายงานว่า ซีโครปิน

ทั้งสองมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ แต่ซีโครปินมีการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากกว่าซีโครปินที่ต่อด้วยฮิทธิดีนเล็กน้อย (Jin et al., 2006)

ในปี 2007 Shen และคณะ ได้ทำการศึกษาการแสดงออกและการทำให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนต์เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ ซีโครปิน จาก *E. coli* มีรายงานว่าสามารถออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ทั้งกับแกรมลบและแกรมบวก เชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Shen et al., 2007)

ในปี 2013 Xia และคณะ ได้ทำการศึกษาการแสดงออก, ทำบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะของการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในซีโครปิน เอ็กเจ จากหนอนไหม *Bombyx Mori* ใน *Saccharomyces cerevisiae* โดยทำการศึกษายีนเพปไทด์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของ ซีโครปิน เอ็กเจ โคลนเข้าไปในเวคเตอร์ pYES2/CT/α และศึกษาการแสดงออกใน *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc1 จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในยีสต์เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ได้โปรตีนจากน้ำหมักประมาณ 1.4 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำไปผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว ได้ซีโครปิน เอ็กเจ ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ รายงานว่า ซีโครปิน เอ็กเจ มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ทั้งกับแกรมลบและแกรมบวก เชื้อแบคทีเรีย (Xia et al., 2013)

ในปี 2014 Téllez และ Castaño ได้ทำการศึกษาการแสดงออกและการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน ต่อการดื้อยาของ *E. coli* มีรายงานว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย แกรมลบได้ และ ได้วางรากฐานการตรวจสอบการทำงานทางชีวภาพของรีคอมบิแนนต์ซีโครปินที่ทำงานร่วมกับลูซิลินและสำรวจวิธีการออกแบบยาต้านจุลินทรีย์ที่ดัดแปลงพันธุกรรมอีกด้วย (Téllez and Castaño-Osorio, 2014)

ในปี 2014 Ji และคณะ ได้มีการศึกษาการพัฒนาการกลายพันธุ์ของรีคอมบิแนนต์เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ระหว่าง ซีโครปิน เอ - เมลิททิน โดยทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนบางตัวให้เป็น

ทริปโตฟราน ดังตารางที่ 2.6 เพื่อเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับกระเพาะอาหารและลำไส้ (Ji et al., 2014)

ตารางที่ 2.6 ลำดับของกรดอะมิโนซีโครปิน เอ – เมลิททิน (Ji et al., 2014)

เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์	กรดอะมิโน
Cecropin A – Melittin (กรดอะมิโนแบบเดิม)	KWKL**F**KKIEK**V**GQGIGAVLK**V**LTT**G**L-NH2
Cecropin A – Melittin (กรดอะมิโนที่พัฒนา)	KWKL**W**KKIEK**W**GQGIGAVLK**W**LTT**W**L-NH2

และรายงานว่า สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ และ เมลิททิน (กรดอะมิโนแบบเดิม) นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นอีกว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนทริปโตฟรานนี้มีผลกระทบต่อเซลล์ปกติเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากรายงานนี้ชี้ให้เห็นว่า การปรับเปลี่ยนกรดอะมิโนทริปโตฟรานนั้นมีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับกระเพาะอาหารและลำไส้ จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการพัฒนายาปฏิชีวนะ (Ji et al., 2014)

ในปี 2015 Zhang และคณะ ได้ทำการศึกษาการผลิตเพปไทด์ที่ต้านจุลินทรีย์ ซีโครปิน เอ ในหนอนไหม *Hyphantria cunea* และ ฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อรา โดยทำการโคลนซีโครปิน เอ เข้าไปยังเวคเตอร์ SUMO จากนั้นนำซีโครปิน เอ ที่อยู่ในเวคเตอร์ SUMO เข้าไปยัง *E. coli* จากนั้นทำบริสุทธิ์ด้วยนิกเกิลคอลัมน์ (Ni-IDA chromatography) ได้โปรตีนประมาณ 496 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการเลี้ยงเชื้อ และทำการทำบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยนิกเกิลคอลัมน์ได้โปรตีนประมาณ 158 มิลลิกรัมต่อลิตร มีรายงานว่า มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราได้ (Zhang et al., 2015)

ซึ่งจากการศึกษาค้นคว้าการผลิตโปรตีนในปัจจุบันเห็นว่า เทคนิคการทำรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอนั้นเป็นทางเลือกที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตและการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลาไม่นานในการผลิตโปรตีนและสามารถควบคุมการผลิตได้ มีการพัฒนาให้สะดวกต่อการทำบริสุทธิ์จึงสนใจที่จะศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนผ่านเทคนิครีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ

2.7 เทคนิคการทำรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ

เทคนิคการทำรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ (Recombinant DNA Technology) เป็นการพัฒนาสิ่งมีชีวิตโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีนด้วยวิธีทางเคมี เทคนิคการทำรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอช่วยให้เกิดผลดีต่ออุตสาหกรรมการเกษตร อุตสาหกรรมเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมเกี่ยวกับยา เนื่องจากเทคนิคนี้ช่วยให้คัดเลือกได้ลักษณะที่ต้องการและสร้างได้ในปริมาณมาก

การศึกษาการแสดงออกในโปรตีนเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่เป็นทางเลือกให้กับนักพันธุวิศวกรรมที่ต้องการจะผลิตโปรตีนที่ต้องการศึกษาในเวคเตอร์ที่ต้องการโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม โดยปกติแล้วในสิ่งมีชีวิตทั่วๆไปมีการผลิตโปรตีนในเซลล์อยู่แล้ว ซึ่งโปรตีนบางตัวถูกผลิตมากบ้าง น้อยบ้าง ดังนั้นหากจะทำการสกัดโปรตีนเหล่านั้นออกมาเพื่อศึกษา อาจจะเป็นการยากหรือต้องใช้เวลานาน ดังนั้นจึงมีเทคนิคที่เรียกว่า การตัดต่อยีนเข้าเวคเตอร์และทำการย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่มีให้เลือกทั้งโปรคารีโอต เช่น *E. coli* หรือยูคารีโอต เช่น ยีสต์, เซลล์แมลง, สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เรียกโปรตีนที่ได้ว่าโปรตีนเชื่อมต่อหรือโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 2.7 (สุขสมทิพย์, 2554)

Chulalongkorn University

การแสดงออกของยีน (gene expression) การแสดงออกของยีนเพื่อสร้างโปรตีนแต่ละชนิดจะเกิดขึ้นในเวลาและปริมาณที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับบทบาทและหน้าที่ของโปรตีนชนิดนั้นๆ ดังนั้นการแสดงออกของยีนจึงมีผลผลิตเป็นโปรตีน การควบคุมการแสดงออกของยีนประกอบด้วยขั้นตอนสองขั้นตอนคือ ขั้นตอนการถอดรหัสจากดีเอ็นเอเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) และขั้นตอนการแปลรหัสจากลำดับเบสของเอ็มอาร์เอ็นเอเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ส่วนใหญ่ในแบคทีเรียจะเกิดการควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นตอนการแปลรหัส ส่วนในยูคารีโอตมีการควบคุมที่ซับซ้อนกว่าเนื่องจากโปรตีนมีความซับซ้อน (สุขสมทิพย์, 2554)

ตารางที่ 2.7 ข้อดีและข้อเสียของการใช้เซลล์เจ้าบ้านต่างๆ (สุขสมทิพย์, 2554)

เซลล์เจ้าบ้าน	ข้อดี	ข้อเสีย
E. coli	- ใช้ได้กับดีเอ็นเอทั่วไป - ควบคุมการแสดงออกของยีนง่าย - ผลผลิตของโปรตีนสายผสมสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์	- โปรตีนสายผสมไม่มี post-translational modification - คุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนต่างจากโปรตีนในธรรมชาติ - แบคทีเรียแกรมลบมี endotoxin สูง - ถ้ามีการแสดงออกมากเกินไป (over expression) จะเกิดการรวมตัวของโปรตีนในรูป inclusion bodies ทำให้แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ยาก
ยีสต์	- ไม่มี endotoxins - ไม่ทำให้เกิดโรคในคน - สามารถนำโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ - สามารถเพาะเลี้ยงได้ในปริมาณมาก	- ควบคุมการแสดงออกของยีนได้ยาก - การใช้ดีเอ็นเอพาหะสำหรับยีสต์ยังยุ่งยากและไม่สะดวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข้อเสียเปรียบของการใช้ *E. coli* คือ เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการโคลนยีนแล้วอาจจะทำให้ยีนของเซลล์ของยูคาริโอตไม่สามารถทำหน้าที่ในเซลล์ *E. coli* ได้ นอกจากนี้การโคลนยีนนั้นบางครั้งมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างโปรตีนอาจทำให้โปรตีนที่สร้างนั้นไม่สามารถทำงานได้ในยูคาริโอต จึงเลือกใช้ยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

2.8 ระบบการแสดงออกยีสต์

ระบบการแสดงออกของยีสต์ได้รับการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง โดยการผลิตโปรตีนในยีสต์ก็มีข้อดีกว่าระบบการแสดงออกของยูคาริโอต เช่น สามารถที่จะเจริญเติบโตในความหนาแน่นของเซลล์สูง อีกทั้งสภาวะในการเพาะเลี้ยงไม่ยุ่งยากซับซ้อน ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้น ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตรีคอมบิแนนต์ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการใช้ระบบของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่เนื่องจากแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตพวกโพรคาริโอตทำให้ขาดกลไกที่สำคัญต่อการสังเคราะห์โปรตีนของสิ่งมีชีวิตพวก ยูคาริโอต ที่เรียกว่า การปรับแต่งโปรตีนหลังจากการแปลรหัส สิ่งชีวิตจำพวกยีสต์จึงเป็นที่น่าสนใจในการใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกเซลล์เดี่ยวที่เป็นยูคาริโอต ระบบการแสดงออกของยีนโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ถูกนำมาใช้อย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตาม *S. cerevisiae* นั้นมีข้อด้อย คือ การเติมหมู่โอลิโกแซคคาไรด์บนโปรตีน ในช่วงการปรับแต่งโปรตีนหลังจากการแปลรหัส จึงส่งผลให้รีคอมบิแนนต์ที่ได้นั้นมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปด้วย และยังมีการปลดปล่อยตัวเองสู่ภายนอกเซลล์จึงส่งผลให้การทำบริสุทธิ์นั้นมีความยากตามไปด้วย จากคุณสมบัติดังกล่าวนั้น *S. cerevisiae* จึงไม่เป็นที่นิยมในการใช้เพื่อผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนทางการแพทย์

นอกจากยีสต์ดังกล่าวแล้วยังมียีสต์ในกลุ่มของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์มีลักษณะใกล้เคียงกับ *S. cerevisiae* แต่เป็นยีสต์ที่มีการปรับแต่งโปรตีนหลังการแปลรหัสที่ใกล้เคียงกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูง

มากกว่า และ อีกทั้งยังสามารถปลดปล่อยตรีคอมบิแนนต์โปรตีนสู่ภายนอกเซลล์ได้ทำให้ง่ายต่อการทำบริสุทธิ์และยังมีโปรโมเตอร์แบบเหนี่ยวนำที่ช่วยให้เกิดการถอดรหัสที่ได้ประสิทธิภาพสูงอีกด้วย จากคุณสมบัติข้างต้นที่กล่าวมานั้นทำให้โปรตีนบางชนิดที่ไม่สามารถแสดงออกได้ในแบคทีเรียและยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถแสดงออกได้ (Cereghino and Cregg, 2000; Cregg et al., 2000)

2.8.1 เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ (Methylotrophic yeast)

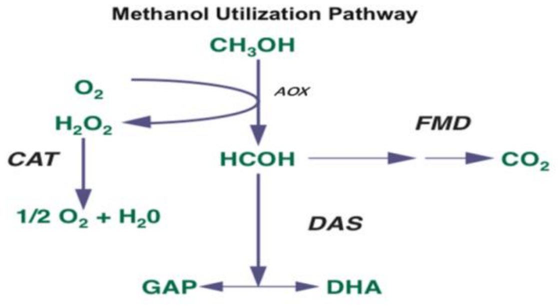
เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ (Methylotrophic yeast) คือ กลุ่มของยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์หลายตัวได้รับการพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของโปรตีน และมีการศึกษากลไกที่มีส่วนร่วมในการแสดงออกของโปรตีน ยีสต์สายพันธุ์ที่มีประโยชน์ที่นิยมใช้ในกลุ่มนี้รวมถึง *P. pastoris, Hansenula polymorpha, Kluyveromyces lactis, Candida boidinii* เป็นต้น (สุขสมทิพย์, 2554)

Methylotrophic yeast เป็นยีสต์ที่มีสามารถใช้เมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผ่านทางวิถีเมตาบอลิซึมของเมทานอลโดยเมธานอลจะถูกสลายด้วยเอนไซม์ที่ชื่อว่าแอลกอฮอล์ออกซิเดส ซึ่งถอดรหัสจากยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดสโดยที่ยีนดังกล่าวมีคุณสมบัติในการแสดงออกอย่างสูงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเมธานอล ดังนั้นจึงอาศัยคุณสมบัติของยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดสใช้เป็นโปรโมเตอร์ (promotor)ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เราต้องการด้วย AOX promotor สามารถที่จะดัดแปลงกระบวนการในการผลิตโปรตีนให้หลั่งออกมาภายนอกเซลล์มีความสามารถในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่สูง (สุขสมทิพย์, 2554)

การใช้เมทานอลในกลุ่มเมทิลโลโทรฟิกยีสต์โดยแอลกอฮอล์ออกซิเดสซึ่งเป็นเอมไซม์แรกในปฏิกิริยาโดยเมทานอลจะถูกออกซิไดซ์เป็นฟอร์มัลดีไฮด์และจากปฏิกิริยาดังกล่าวนั้นมีผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพื่อลดความเป็นต่อเซลล์จะมีแคทแทเลส

(Catalase) ทำหน้าที่สลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ควบคู่กับการออกซิไดซ์เมทานอล จะเกิดผลิตภัณฑ์ คือ ฟอร์มาลดีไฮด์และน้ำ ดังนั้น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการสลายเมทานอลนั้นจะเกิดควบคู่กับแอลกอฮอล์ออกซิเดสและแคทแทเลสภายในเพอรอกซิโซม (peroxisome) โดยฟอร์มัลดีไฮด์ที่ได้ส่วนหนึ่งจะถูกออกซิไดซ์เป็นฟอร์เมท (formate) และคาร์บอนไดออกไซค์ โดยเกิดปฏิกิริยาดีไฮโดรจิเนส ซึ่งทั้ง 2 ปฏิกิริยานั้นจะเกิดขึ้นในไมโตคอนเดรีย ซึ่งแอลกอฮอล์ออกซิเดส จะพบอยู่ภายในเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตโดยการใช้เมทานอล แต่จะไม่พบในแหล่งคาร์บอนอื่นๆ เช่น กลีเซอรอล เป็นต้น ดังรูปที่ 2.9 (Cereghino and Cregg, 2000; Cregg et al., 2000; Higgins and Cregg, 1998; Macauley et al., 2005)

ในการควบคุมยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดส ประกอบด้วยกัน 3 กลไก คือ ยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดสจะถูกกดดันเมื่อมีกลูโคส กลีเซอรอล และ เอทานอล กลไกที่สอง คือ ลดกลไกการกดดันยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดสโดยจำกัดแหล่งคาร์บอนลง (Jahic et al., 2002) กลไกสุดท้าย คือ เหนี่ยวนำยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดสโดยการเติมเมทานอลลงไปในปฏิกิริยา (Cereghino and Cregg, 2000)



รูปที่ 2.9 การใช้เมทานอลในกลุ่ม Methylotrophic yeast

ยีสต์นิยมใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนได้ในปริมาณมากที่ความเข้มข้นของ

เซลล์สูง พลาสมิดพาหะที่ใช้ในระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนในยีสต์มีการพัฒนาให้มีความเหมาะสมมากขึ้น ซึ่งเลือกใช้ได้อย่างหลากหลาย อีกทั้งยังสามารถควบคุมให้มีการแสดงออกของยีนในปริมาณสูงได้ (Çelik and Çalık, 2012) ในหลายปีที่ผ่านมายีสต์ที่นิยมใช้ คือ *P. pastoris*

2.8.2 *Pichia pastoris*

P. pastoris มีการจัดหมวดหมู่ดังภาพที่ 2.10 ซึ่งยีสต์ชนิดนี้จัดเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว อีกทั้งยังเป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ซึ่งสามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นแหล่งพลังงานซึ่งมี AOX (ถอดรหัสจากยีน *AOX*) เป็นโปรโมเตอร์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญเติบโตในอาหารที่มีเมทานอล และแสดงออกภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์เหล่านี้ และสามารถเพาะเลี้ยงในสภาพความหนาแน่นของเซลล์สูงและน้ำหนักเซลล์แห้งสามารถเข้าถึงได้ถึง 200 กรัมต่อลิตร (Çelik and Çalık, 2012)

- Kingdom: Fungi
    - Division: Eumycota
        - Subdivision: Ascomycotina
            - Class: Hemoascomycetes
                - Order: Endomycetales
                    - Family: Saccharomycetaceae
                        - Sub-family: Saccharomycetoideae
                            - Genus: *Pichia*
                                - *Pichia pastoris*

รูปที่ 2.10 การจัดจำแนกยีสต์ *P. pastoris*

2.8.2.1 พันธุกรรมของยีสต์ที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน

2.8.2.1.1 สายพันธุ์ของ *P. pastoris* ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

สายพันธุ์ของยีสต์ *P. pastoris* ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านแบ่งตามการใช้เมทานอล ประกอบด้วยสายพันธุ์ X33 ,GS115 และ KM71H (Invitrogen, 2005) โดยแต่ละสายพันธุ์พบว่าการแสดงออกของยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดสสามารถพบได้ทั้ง 2 ชนิดในยีสต์ *P. pastoris* คือ *AOX1* และ *AOX2* ซึ่งเป็นยีนหลักที่ทำหน้าที่ในการสร้างแอลกอฮอล์ออกซิเดสซึ่งเป็นเอมไซม์ที่ใช้ชนิดแรกที่ใช้ในวิถีเมตาบอลิซึมของเมทานอล (Couderc and Baratti, 1980) โดยจะเรียกสายพันธุ์ตามการใช้เมทานอล คือ Mut^{+} เป็นสายพันธุ์ที่ *AOX1* และ *AOX2* ยังสามารถทำงานได้ตามปกติ ดังนั้นจึงเป็นสายพันธุ์ที่ใช้เมทานอลในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ส่วน Mut^{S} เป็นสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *AOX1* แต่ยังมียีน *AOX2* ยังสามารถทำงานได้ตามปกติ ซึ่งโดยปกติแล้ว *AOX1* มีบทบาทในวิถีเมตาบอลิซึมของเมทานอลถึง 85 เปอร์เซ็นต์ ส่วน ยีน *AOX2* นั้นมีบทบาทในวิถีเมตาบอลิซึมของเมทานอลเพียงแค่ 15 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น จึงทำให้สายพันธุ์นี้เจริญเติบโตได้น้อยกว่า Mut^{+} สายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยได้แก่สายพันธุ์ X33, GS115 และ KM71H โดยถ้าแบ่งตามกลุ่มการใช้เมทานอลแล้วจะแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Mut^{+} และ Mut^{S} ซึ่ง สายพันธุ์ X33 (เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม) และจัดอยู่ในกลุ่มของ Mut^{+} สายพันธุ์ GS115 และเป็นสายพันธุ์ที่ใช้เมทานอลได้อย่างรวดเร็วในการเจริญเติบโต Mut^{+} ซึ่งมี *AOX1* และ *AOX2* เป็นโปรโมเตอร์ แต่ สายพันธุ์ GS115 มีการกลายพันธุ์ที่ยีนฮีสทิดีน ดังนั้น ในการเลี้ยงจำเป็นจะต้องเติมฮีสทิดีนในการเจริญเติบโต และสายพันธุ์ KM71H เป็นสายพันธุ์ที่ใช้เมทานอลได้อย่างช้า Mut^{S} เนื่องจาก *AOX1* ถูกกำจัดไม่ให้ใช้งาน แต่ยังมี *AOX2* จึงทำให้สายพันธุ์นี้เจริญได้อย่างช้า ดังตารางที่ 2.8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 2.8 จีโนไทด์และฟีโนไทด์ของยีสต์ *P. pastoris* ในสายพันธุ์ต่างๆ (Invitrogen, 2005)

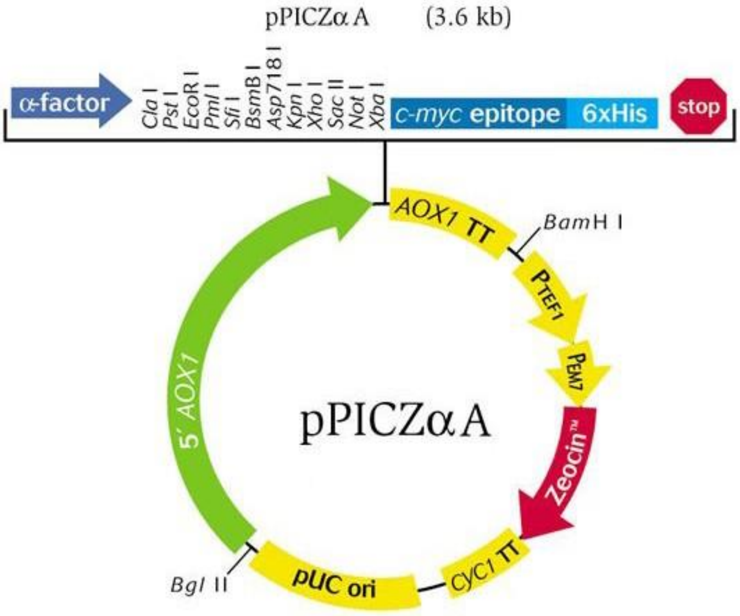
สายพันธุ์	จีโนไทด์	ฟีโนไทด์
X33	Wild type,	Mut^{+}
GS115	*his4*	Mut^{+}, His^{-}
KM71H	*arg4 aox1 :: ARG4*	Mut^{s}, ARG^{+}

Mut^{+} phenotype: methanol utilization plus; Mut^{s} phenotype: methanol utilization slow

2.8.2.1.2 เวคเตอร์สำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีน

เวคเตอร์สำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีน คือ pPICZα – A ดังรูปที่ 2.11 (Invitrogen, 2005) เวคเตอร์ชนิดนี้สามารถเหนี่ยวนำโปรโมเตอร์ *AOX* ด้วยเมทานอลเพื่อให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีน และยังมี selectable marker ชนิด antibiotic marker โดย พลาสมิดจะมียีน *bler* ทำให้เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดสามารถทนต่อสารปฏิชีวนะซีโอซินและสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะซีโอซินได้ (Higgins and Cregg, 1998)

นอกจากนี้ยังมีลำดับดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับรีคอมบิแนนต์ยีนที่เรียกว่า secretion signal ซึ่งเมื่อเกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีนแล้วจะช่วยให้รีคอมบิแนนต์โปรตีนถูกนำออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ง่ายต่อการเก็บผลผลิต (Cereghino and Cregg, 2000) ทั้งนี้ *AOX* ยังมีข้อดีและข้อเสียดังตารางที่ 2.9



รูปที่ 2.11 แผนที่เวคเตอร์ของ pPICZα – A

ตารางที่ 2.9 ข้อดีและข้อเสียของ *AOX* (Macauley et al., 2005)

ข้อดี	ข้อเสีย
- การแสดงออกของยีนถูกควบคุมอย่างรัดกุมในระดับการถอดรหัสด้วยยีน	- การวัดความเข้มข้นของเมทานอลเป็นไปได้ยาก
- รีคอมบิแนนต์โปรตีนแสดงออกได้สูงแม้ว่าโปรตีนที่ผลิตได้จะเป็นพิษ	- เมทานอล อันตราย ติดไฟง่ายย
- การเหนี่ยวนำเกิดขึ้นได้ง่ายโดยการเติมเมทานอล	

2.9 ปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยง *P. pastoris*

2.9.1 อิทธิพลของค่ากรด - ด่าง

ค่ากรด - ด่าง มีผลต่อระบบการแสดงออกของยีนโดย *P. pastoris* หลายรูปแบบ คือ ผลของการเจริญเติบโต โดย *P. pastoris* สามารถเจริญได้ในช่วงค่ากรด - ด่าง 3 ถึง 7 ในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนโดย *P. pastoris* นั้น ค่ากรด - ด่าง มีผลต่อการผลิตในด้านอัตราการผลิต และกิจกรรมของโปรติเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Jahic et al., 2002) ซึ่งในเชื้อสายพันธุ์ GS115 นั้นมีรายงานว่า สามารถผลิตได้ดีในช่วงของค่ากรด - ด่างที่ 6 (Jin et al., 2006)

2.9.2 อิทธิพลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยอย่างนึงที่สำคัญเป็นอย่างมากในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนเนื่องจากอุณหภูมิส่งผลต่อการเสื่อมสลายของรีคอมบิแนนต์โปรตีน และอาจทำให้โปรติเอสโดยโปรติเอสจะทำการย่อยสลายรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ต้องการ ซึ่งการลดอุณภูมิในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนสามารถเพิ่มผลผลิตได้และช่วยให้โปรติเอสลดลง (Jahic et al., 2003a) ส่วนมากในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนโดย *P. pastoris* จะใช้อุณหภูมิที่ต่ำ เนื่องจาก ในช่วงอุณหภูมิดังกล่าวจะช่วยลดโปรตีนโปรติเอส ซึ่งมีรายงานว่า เชื้อสายพันธุ์ X33 และ GS115 สามารถผลิตโปรตีนได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่ 29 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Liu et al., 2015; Ouyang et al., 2015; Zhang et al., 2015)

2.9.3 อิทธิพลของอัตราการเติมเมทานอล

โดยปกติแล้วจุลินทรีย์ต่างๆ นั้นมีความไวต่อเมทานอล แต่สำหรับเมทิลโลโทรฟิกยีสต์แล้วนั้นสามารถทนต่อเมทานอลได้ที่ความเข้มข้นระหว่าง 3 ถึง 5 กรัมต่อลิตร ซึ่งระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *AOX* และยังไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของ

ยีสต์อีกด้วย ความเข้มข้นของเมทานอล ดังกล่าว นั้นอาจจะส่งผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนได้ (Khatri and Hoffmann, 2006) เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นตัวเหนี่ยวนำทำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนเพิ่มมากขึ้น แต่ถ้ามากจนเกินไปเมทานอลจะทำให้เซลล์ตายและมีโปรติเอสมากขึ้นในการผลิต (Katakura et al., 1998; Mayson et al., 2003) ซึ่งมีรายงานว่า เชื้อสายพันธุ์ GS115 มีรายงานว่า สามารถผลิตได้ดีในช่วง 0.5 - 1 เปอร์เซ็นต์ (Ouyang et al., 2015; Zhang et al., 2015)

2.10 เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบซีโครปิน

ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบซีโครปิน มีดังตารางที่ 2.10 (Guo et al., 2012; Jin et al., 2006; Mauricio et al., 2012; Shen et al., 2007; Téllez and Castaño-Osorio, 2014; Xia et al., 2013; Xu et al., 2007a; Xu et al., 2007b)

ตารางที่ 2.10 ตัวอย่างของเทคนิคที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์ของซีโครปิน

เปปไทด์ต้านจุลินทรีย์	แหล่งผลิต	เซลล์เจ้าบ้านที่ใช้	เทคนิคที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์	(มิลลิกรัมต่อลิตร)
ซีโครปิน	*M. domistica*	*P.pastoris*	Affinity Columns (Nickel Sepharose)	2
ซีโครปิน เอ และ มาไกนิน	-	*E.coli*	Affinity Columns (Ni-NTA)	6.8
ซีโครปิน เอ็กซ์	*B.mori*	*E.coli*	CM cellulose column	100
ซีโครปิน	*M. domistica*	*E.coli*	Affinity Columns (His Trap HP)	11.2
ซีโครปิน เอ	*D.melanogaster*	*E.coli*	Affinity Columns (Chitin)	2.5
ซีโครปิน ดี	Chemical Synthesis	*P.pastoris*	-	485.24
ซีโครปิน เอ็กซ์เจ	*B.mori*	*E.coli*	Affinity Columns (Ni-NTA)	1444
ซีโครปิน	*l. sericata*	*E.coli*	Affinity Columns (Ni-IMAC)	70

2.10.1 เทคนิคโครมาโตกราฟี

โครมาโตกราฟี เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสารชีวะโมเลกุล เนื่องจาก มีหลักการประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย สารที่แยกได้นั้นสามารถนำมาวิเคราะห์ หรือ วัดปริมาณได้ทันที แล้วยังสามารถเตรียมสารในปริมาณมากได้ หลักการแยกและทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์แบ่งออกได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด ดังตารางที่ 2.11

ตารางที่ 2.11 หลักการแยกและคุณสมบัติของสาร

คุณสมบัติ	เทคนิค	ขนาด
ขนาด หรือ มวล	โครมาโตกราฟแบบเจลฟิลเตรชัน	เล็ก
ประจุ	โครมาโตกราฟแบบแลกเปลี่ยนประจุ	เล็ก – ใหญ่
ความจำเพาะกับสารบางชนิด	โครมาโตกราฟแบบจำเพาะ	เล็ก

***2.10.1.1 โครมาโตกราฟแบบเจลฟิลเตรชัน** (Gel Filtration Chromatography)*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารประกอบขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่ใช้ในการกำจัดสารปนเปื้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยๆ และยังใช้ประโยชน์ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารได้อีกด้วย

2.10.1.2 โครมาโตกราฟ แบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchanger chromatography)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสาร เช่น โปรตีน กรดอะมิโน และ กรดนิวคลีอิก โดยอาศัยความแตกต่างของประจุไฟฟ้าของสาร สารที่มีประจุสามารถแลกเปลี่ยนกับไอออนอื่นที่มีประจุชนิดเดียวกันเพื่อจับกับหมู่ที่มีประจุตรงกันข้ามของการแลกเปลี่ยนประจุด้วยแรง electrostatic force

โครมาโตกราฟ แบบแลกเปลี่ยนประจุ มี 2 ชนิด คือ

1. ชนิดแลกเปลี่ยนแอนไอออน: มีหมู่ที่มีประจุบวก จะจับกับไอออนที่มีประจุลบ
2. ชนิดแลกเปลี่ยนแคทไอออน: มีหมู่ที่มีประจุลบ จะจับกับไอออนที่มีประจุบวก

2.10.1.3 โครมาโตกราฟ แบบจำเพาะ (affinity chromatography)

เป็นเทคนิคหนึ่งของการแยกสารโดยใช้เฟสนิ่งที่เป็นตัวดูดซับ สารที่ต้องการแยกมีความจำเพาะ (specificity) ที่จะจับกับสารที่ถูกตรึงหรือที่เรียกว่าลิแกน (ligand) อยู่กับ insoluble bed material (matrix) อย่างผันกลับได้ สารที่ไม่มีความจำเพาะกับลิแกนจะถูกชะออกไปจากคอลัมน์ ส่วนสารที่ต้องการจะถูก ชะออกโดยการใช้จำเพาะ (specific affinity elution) หรือ non-specific elution โดยการเปลี่ยนแปลงค่ากรด - ด่างหรือ ionic strength ของบัฟเฟอร์ที่ใช้

2.10.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

ในปี 2015 Ouyang และคณะ ได้ทำการศึกษาโครงสร้างและการวิเคราะห์การแสดงออกของ ซีโครปิน อี จาก ไหม *Bombyx mori* โดยศึกษาระดับการแสดงออกของการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตซีโครปิน อี ในไหม โดยได้ฉีดแบคทีเรียเข้าไปยังตัวไหมเพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นในตัวไหม จากนั้นนำอวัยวะต่างๆ มาตรวจสอบด้วยเทคนิค Real time PCR มีรายงานว่า มีการแสดงออก

รวดเร็วภายใน 12 ชั่วโมง และอวัยวะที่พบซีโครปิน อี มากที่สุด คือ อวัยวะขับถ่าย เช่น ทางเดินอาหารส่วนท้าย และ ท่อมัลพิเกียน และพบได้เล็กน้อยในกระเพาะ (Ouyang et al., 2015)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (DNA) ในหลอดทดลอง เป็นเทคนิคพื้นฐานที่สำคัญอณูพันธุศาสตร์ที่มีการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย โดยอาศัยเอมไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสในการทำปฏิกิริยาร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 2 เส้น เอมไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจะนำนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิดมาต่อกันเป็นสายดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ โดยสายดีเอ็นเอจะเรียงตามเบสที่เป็นคู่สมกันบนเส้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

Real-time PCR หรือที่รู้จักกันในชื่อ Quantitative PCR (qPCR) เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนามาจากการทำ PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) โดยใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสงประเภท fluorochrome ทำให้สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นจากสิ่งต้องการตรวจวัดได้และสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน

2.10.2.1 ความแตกต่างระหว่าง Conventional กับ Real time PCR

ใน PCR แบบธรรมดา (conventional PCR) ไม่สามารถรู้ได้ว่าเกิดอะไรขึ้นระหว่างทาง จะต้องประมาณว่า ต้องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิกี่รอบ จึงจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เพียงพอต่อการตรวจวัด และต้องมีการ run gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบดูทั้งปริมาณและขนาดของผลิตภัณฑ์เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ในขณะที่ในระบบ Real time PCR สามารถติดตามดูปฏิกิริยาได้ทุกระยะระหว่างที่กำลังดำเนินอยู่ และสามารถกำหนดจุดที่จะเก็บข้อมูลเพื่อนำมาวิเคราะห์ในภายหลังได้ นอกจากนี้มีวิธีพิสูจน์ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ได้โดยใช้วิธีดู melting curve หลังปฏิกิริยา โดยไม่ต้องนำมา run gel อีก

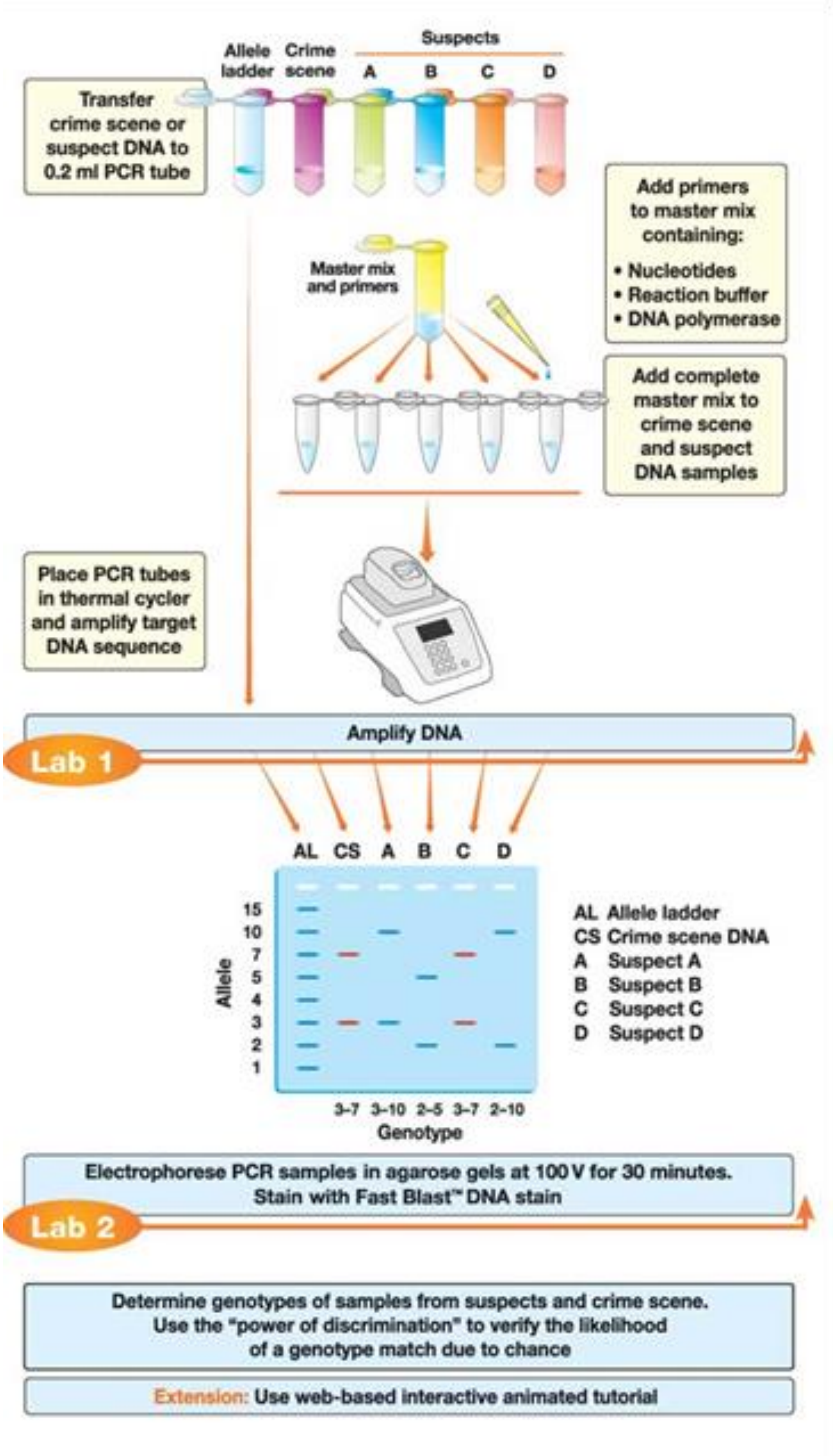
วิธีการ real-time PCR เป็นวิธีการหาปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา PCR ในแต่ละรอบทำให้ได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนจริงจากค่าของ exponential phase ที่ได้จากการเริ่มต้น

ของดีเอ็นเอเป้าหมาย แล้วนำจำนวนรอบที่ตรงกับค่า Threshold (Threshold cycle ; CT) นำไปวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเริ่มต้นซึ่งสามารถคำนวณได้โดยจะต้องเปรียบเทียบกับยีนอ้างอิง (reference gene) โดยยีนที่ใช้คือ Actin gene (housekeeping gene) จำนวนเท่าของการแสดงออกของยีน คำนวณได้จากสมการ ดังนี้

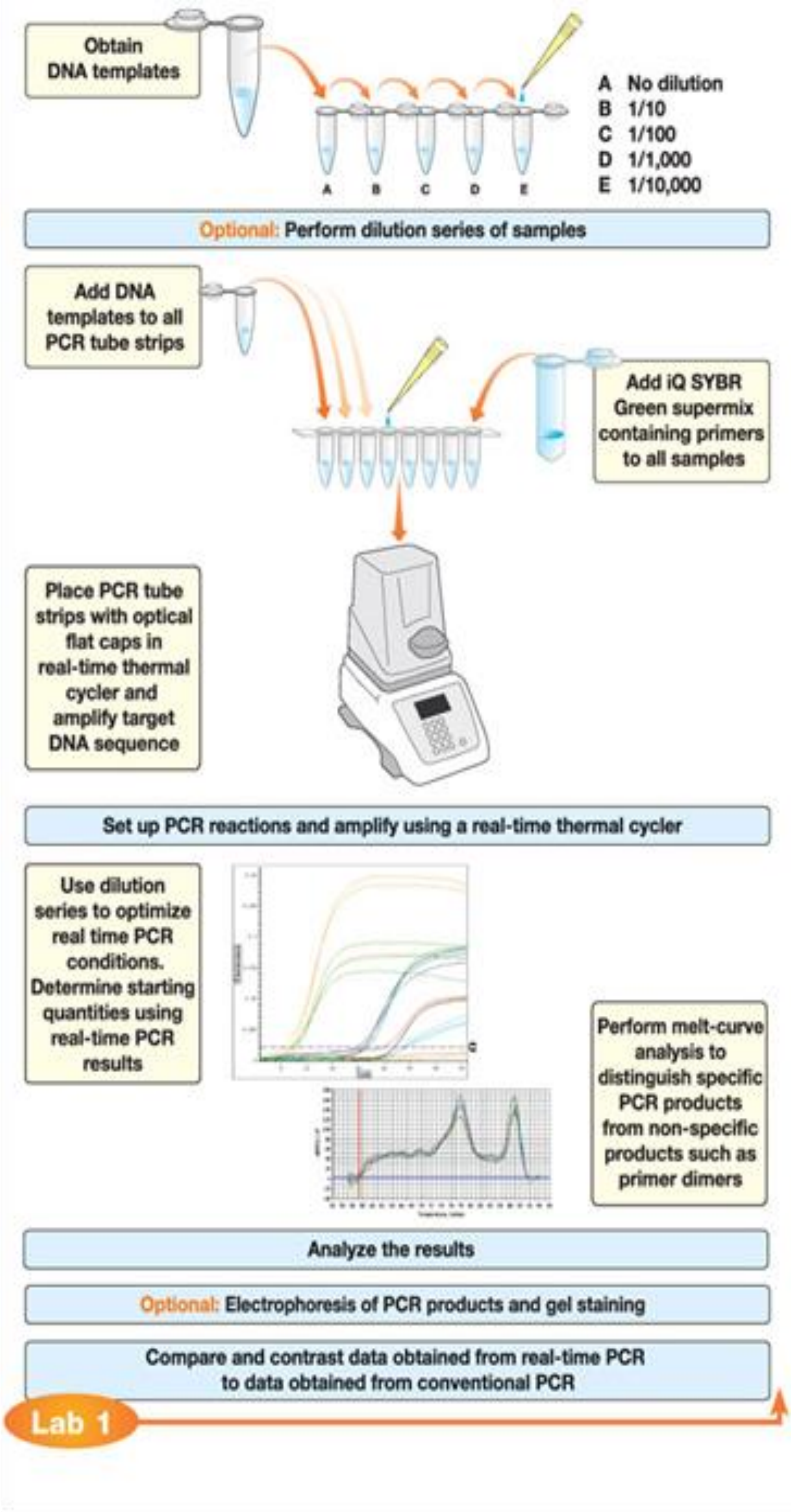
$$R = 2 - (\Delta CT\ sample - \Delta CT\ reference)$$

นอกเหนือจากการใช้เทคนิค Real-Time PCR ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณแล้ว ยังได้มีการพัฒนาให้สามารถวิเคราะห์เชิงคุณภาพได้ด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 2.12 ขั้นตอนการทำ PCR แบบปกติ

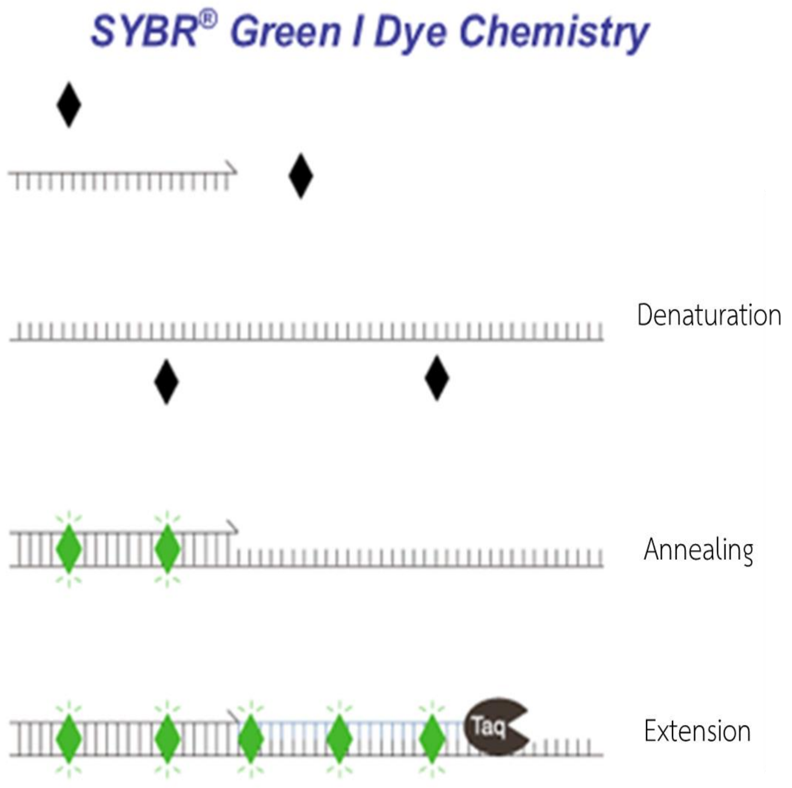


รูปที่ 2.13 ขั้นตอนการทำ Real time PCR

2.10.2.1.2 สารเรืองแสงที่ใช้ใน Real time PCR

2.10.2.1.2.1 SYBR Green I

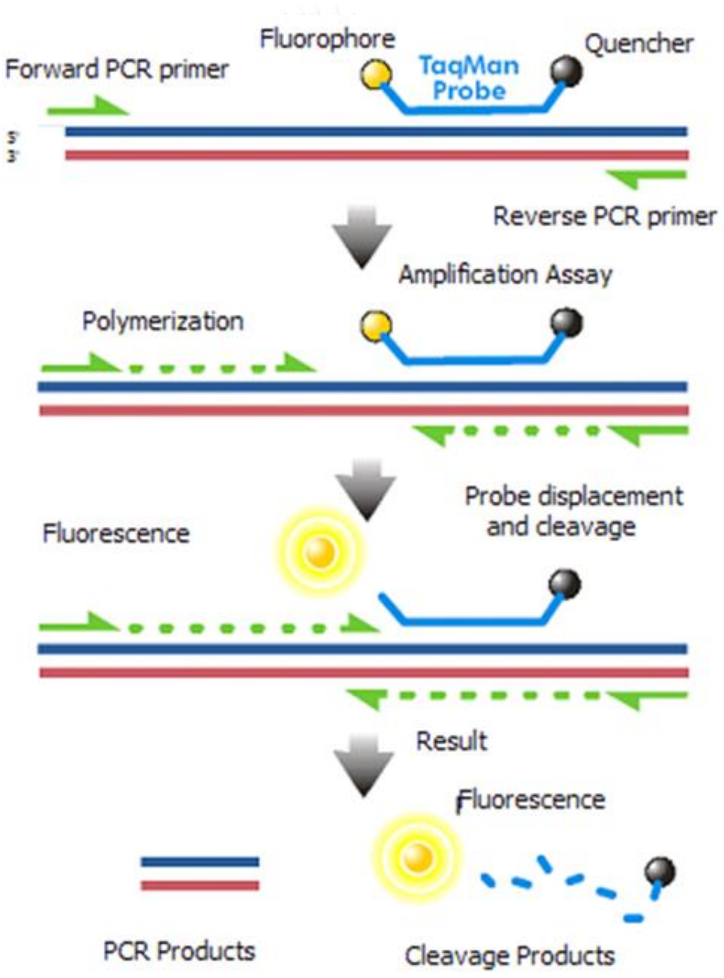
SYBR Green I เป็นสารเรืองแสงที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบันเนื่องจากมีราคาไม่แพง หลักการการทำงานของสารเรืองแสงชนิดนี้คือ เข้าไปจับกับไมเนอร์กรูฟของดีเอ็นเอสายคู่ ในช่วง Denaturation ของปฏิกิริยาเพื่อคลายสายดีเอ็นเอออกให้เป็นสายเดี่ยว นอกจากนี้ สารเรืองแสงนี้จะไม่เข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว แต่เมื่อเข้าสู่ Annealing และ Extension สีของสารเรืองแสงจะแทรกตัวไปจับกับดีเอ็นเอสายคู่และเรืองแสงออกมา และเมื่อมาถึง Denaturation อีกครั้ง สารเรืองแสงจะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอทำให้เรืองแสงลดลง ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 หลักการทำงานของสารเรืองแสง SYBR Green I

2.10.2.1.2.2 Probes based (Taqman)

Probes based: ใช้ probe ซึ่งดีเอ็นเอที่มีสายเดี่ยวที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ติดตัวเปล่งแสงลักษณะต่างๆ กันออกไปมีการออกแบบ probe ลักษณะนี้ออกมามากมายเพื่อเอื้อตอการตรวจวัดโดยวิธี Real time PCR ดังรูปที่ 2.15 ยกตัวอยางเชน Taqman, Dual-labelled probes, MGB Hybridisation probes, Molecular Beacons, AmpliFluor probes เป็นต้น



รูปที่ 2.15 หลักการทำงานของสารเรืองแสง Probes based (Taqman)

2.10.2.1.3 ลักษณะของการใช้งานใน Real time PCR

การใช้งานในการวิเคราะห์ปริมาณมีการตรวจวัดสารเรืองแสงของตัวเปล่งแสงในปฏิกิริยาในเชิงปริมาณ สามารถมองเห็นในการเพิ่มจำนวนในทุกรอบ สัญญาณในช่วง exponential phase จะสัมพันธ์กับปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอต้นแบบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

อุปกรณ์และวัสดุ	บริษัท , ประเทศ
กระดาษกรองสารสำหรับไซริงค์ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Syringe filter) (Polytetrafluorethylene) (PTFE)	Hirayama manufacturing Corp., ญี่ปุ่น
ไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน (Nitrocellulose membrane) (NitroBind™) เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hot plate) (PC-101)	Life Science Products, Inc., สหรัฐอเมริกา Corning, สหรัฐอเมริกา
เครื่องชั่งแบบกล (Mechanical balance) (Balance Adventurer™, AR 2140)	Ohaus Corp., สหรัฐอเมริกา
เครื่องทำบริสุทธิ์ (ÄKTA start)	GE healthcare, อังกฤษ
เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) (6500)	Kubota Corp., ญี่ปุ่น
เครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน (High speed micro refrigerated centrifuge) (MTX-150)	Tomy Seiko Co., Ltd., ญี่ปุ่น
เครื่องผสมสารละลาย (Vortex) (KMC-1300V)	Vision scientific Co., Ltd., เกาหลีใต้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อุปกรณ์และวัสดุ	บริษัท , ประเทศ
เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Real-Time Thermal Cycler) (C1000)	BIO-RAD , สหรัฐอเมริกา
เครื่องแยกโปรตีนพร้อมเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าแบบปรับค่าได้ (Vertical electrophoresis)	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
เครื่องวัดความเข้มข้นสารละลายด้วยคลื่นแสง (UV-Visible recording spectrophotometer) (UV-160)	Shimadzu Corp., ญี่ปุ่น
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Accumet® AB15)	Fisher Scientific, สิงคโปร์
เครื่องวิเคราะห์ ดี เอ็น เอ บนแผ่นวุ้น (UV transilluminator)	UVItec, อังกฤษ
เครื่องวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารละลาย (Nanodrop 2000)	Thermo scientific, สหรัฐอเมริกา
เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Bench-top centrifuge, WiseSpin® CF-10)	Dihan scientific Co., Ltd., เกาหลีใต้
เครื่องอิเลคโตรพอเรชั่น (electrophoresis) (Mupid®-EXU Submarine electrophoresis system)	Bio-Rad Laboratories, Inc., จีน
ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Refrigerated incubator shaker) (Innova™ 4330)	New Brunswick Scientific Co., Inc., สหรัฐอเมริกา

อุปกรณ์และวัสดุ	บริษัท , ประเทศ
ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (MIR 152)	Sanyo Electric Co., Ltd., ญี่ปุ่น
ตู้ปลอดเชื้อ (Biological safety cabinet Heal force®, HFsafe-1200)	Shanghai Lishen Scientific equipment Co., Ltd., จีน
ตู้เย็น – 80 (Freezer – 80°C)	Sanyo Electric Co., Ltd. , ญี่ปุ่น
ตู้เย็น 2 – 4 องศาเซลเซียส (Refrigerator 2 -4 °C)	Panasonic Appliances Lights Action Alliance Co., Ltd., ไทย
ปิเปตต์อัตโนมัติ ขนาด 1-5 มิลลิลิตร (Automatic micropipette 1-5 mL)	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
ปิเปตต์อัตโนมัติ ขนาด 2, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Automatic micropipette P2, P20, P200 and P1000 HTL LABMATEPRO)	HTL LAB SOLUTION, โปแลนด์
ไมโครเวฟ (Microwave oven) (National®)	Matsushita Electric Co. Ltd., ญี่ปุ่น
ส่งถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (Electroporation) (MicroPulser™)	Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา
หม้อนึ่งความดันฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave HV-50)	Hirayama manufacturing., ญี่ปุ่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัท , ประเทศ
กรดอะซิตริก (Acetic acid)	Merck, เยอรมนี
กรดเอทิลลีนไดเอมีนเตตตร้าอะซีติก (Ethylenediaminetetraacetic acid) (EDTA)	Carlo Erba Reagenti, อิตาลี
กลีเซอรอล (Glycerol)	Ajax Chemicals, ออสเตรเลีย
กลูโคส (Glucose)	Carlo Erba Reagenti, อิตาลี
กลูตารอลดีไฮด์ (Glutaraldehyde)	Merck, สหรัฐอเมริกา
แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride)	Merck, เยอรมนี
โคบอลต์คลอไรด์ (Cobalt chloride hexahydrate)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
ซอร์บิทอล (Sorbitol)	Fluka, เยอรมนี
ซัลฟลูริค (Sulfuric acid)	Merck, เยอรมนี
ซีโอซิน (Zeocin™)	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
โซเดียม เอไซด์ (Sodium azide)	Merck, เยอรมนี
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)	Ajax Chemicals, ออสเตรเลีย
โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate)	Bio basic, Inc., แคนาดา
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	Ajax Finechem Pty, Ltd., ออสเตรเลีย
ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder (1 kb), M11)	SibEnzyme, Ltd., รัสเซีย
ไดไทโอเทียรทอล (Dithiothreitol) (DTT)	Bio basic, Inc., แคนาดา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารเคมี	บริษัท , ประเทศ
ไดอะมิโนเบนซิดีน (DAB : 3,3'-Diaminobenzidine)	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
เตตระเมทิลเบนซิดีน (Tetramethylbenzidine)	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
ทริปโตน (Tryptone powder)	Bio basic, Inc., แคนาดา
ทริส (Tris)	Research organics, Inc., สหรัฐอเมริกา
ทริสอะซิเตตอีดีทีเอ (Tris-acetate-EDTA)	Bio basic, Inc., แคนาดา
ทวีน 20 (Tween-20)	Sigma Aldrich, เยอรมนี
ไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน (Nitrocellulose membrane) (NitroBind™)	Life Science Products, Inc. , สหรัฐอเมริกา
ไบโอติน (Biotin)	Fluka, เยอรมนี
โปรตีนมาตรฐาน (BSA)	Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
เพปโทน (Bacto™ Peptone powder)	Becton, Dickinson and Company, ฝรั่งเศส
เมทานอล (Methanol)	Merck, เยอรมนี
ยีสต์ไนโตรเจนเบส (Yeast nitrogen base)	Bio basic, Inc., แคนาดา
วุ้นเตรียมอาหาร (Agar)	Merck, เยอรมนี
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract powder)	Bio Springer, ฝรั่งเศส
เอชอีพีอีเอส (HEPES) (Free acid)	Bio basic, Inc., แคนาดา
อะกาโรส (Agarose) (Molecular biology grade)	Research organics, Inc., สหรัฐอเมริกา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารเคมี	บริษัท , ประเทศ
เอทิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide)	Bio basic, Inc., แคนาดา
แอลกอฮอล์ (Alcohol)	Merck, เยอรมนี
ไฮโดรเจน เพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)	Merck, เยอรมนี
แอนไทฮิสแท็ก ต่อด้วย เฮชอาร์พี (Anti His tag HRP conjugate)	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา

3.1.3 ไพรเมอร์และเอมไซม์

ไพรเมอร์และเอมไซม์	บริษัท , ประเทศ
α-factor primer	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
3’AOX reward primer	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
5’AOX forward primer	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Actin forward primer (5’ GGTATTGCTGAGCGTATGCAAA 3’)	BioDesign Co., Ltd., ไทย
Actin reward primer (5’ CCACCGATCCATACGGAGTACT 3’)	BioDesign Co., Ltd., ไทย
CA forward primer (5’ GACTGGTTCCAATTGACAAG 3’)	BioDesign Co., Ltd., ไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ไพรเมอร์และเอมไซม์	บริษัท , ประเทศ
CA reward primer (5’ CTTAGCGATCTGGGTCGCCTG 3')	BioDesign Co., Ltd., ไทย
i-*Taq* DNA polymerase	iNtRON Biotechnology, เกาหลีใต้
PsT I	Roche, เยอรมนี
Lyticase	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
RNase A (Ribonuclease A)	New England Biolab, อังกฤษ
Sac I	Roche, เยอรมนี
T4 DNA ligase	Promega, สหรัฐอเมริกา

3.1.4 Kits

Kits	บริษัท , ประเทศ
E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit	Omega Biotek, จอเจีย
E.Z.N.A.® Yeast RNA Kit	Omega Biotek, จอเจีย
Tetro Reverse Transcription Kit	Bioline สิงคโปร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.1.5 จุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10F’ ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการเพิ่ม ปริมาณพลาสมิดและรีคอมบิแนนต์ยีสต์ *P. pastoris* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ X-33 (Mut^+), GS115 (Mut^+) และ KM71H (Mut^S) จาก Invitrogen สหรัฐอเมริกา

3.1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ LB Zeocin ™ ถูกนำมาใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อรีคอมบิแนนต์ *E. coli* และใช้อาหาร YPD Zeocin ™ สำหรับเลี้ยงเชื้อรีคอมบิแนนต์ยีสต์ และอาหาร YPG ใช้สำหรับขั้นตอนการผลิตเซลล์ยีสต์และอาหาร BMMY ที่มีเมทานอลเป็นส่วนประกอบใช้สำหรับเหนี่ยวนำในขั้นตอนการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน องค์ประกอบของอาหารได้อธิบายไว้ใน ภาคผนวก ก

3.1.7 พลาสมิด pPICZαA :: CAPP

พลาสมิด pPICZαA :: CAPP เป็นพลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของซีโครปิน เอ (CA) ต่อกับโพลีโพลีน (Polyproline ,PP) และ ฮิสติดีน (his-tag) ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ CAPP - his-tag ที่ต่ออยู่บนเวคเตอร์ pPICZαA แสดงในรูป 3.1 ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณโพลีโพลีนสามารถถูกกำจัดออกด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst I*

```
ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA
 M   R   F   P   S   I   F   T   A   V   L   F   A   A

TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT
 S   S   A   L   A   A   P   V   N   T   T   T   E   D

GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA
 E   T   A   Q   I   P   A   E   A   V   I   G   Y   S
                    α-factor signal
GAT TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC
 D   L   E   G   D   F   D   V   A   V   L   P   F   S

AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT
 N   S   T   N   N   G   L   L   F   I   N   I   I   I

GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA
 A   S   I   A   A   K   E   E   G   V   S   L   E   K
                      EcoRI
AGA GAG GCT GAA GCT GAA TTC AAG TGG AAG CTG TTC AAG AAG
 R   E   A   E   A   E   F   K   W   K   L   F   K   K
                        Cecropin A
ATC GAG AAG GTC GGC CAG AAC ATC CGC GAT GGC ATC ATC AAG
 I   E   K   V   G   Q   N   I   R   D   G   I   I   K

GCT GGT CCG GCT GTC GCA GTC GTC GGC CAG GCG ACC CAG ATC
 A   G   P   A   V   A   V   V   G   Q   A   T   Q   I
          PstI                     Polyproline
GCT AAG CTG CAG CCA CCT CCG CCA CTG CCA CCT CGC GCT ACC
A    K   L   Q   P   P   P   P   L   P   P   R   A   T
        PstI        6 x his tag        STOP
CCG  CTG CAG CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA TCG GTA CCT
 P    L   Q   H   H   H   H   H   H  STOP S   V   P
```

รูปที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของซีโครปิน เอ pPICZαA :: CAPP

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 สร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีนซีโครปิน เอ อยู่บนพาหะดีเอ็นเอ pPICZαA

นำพลาสมิดลูกผสม (pPICZαA :: CAPP) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *Pst I* เพื่อนำเอาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอถอดรหัสให้โพลีโพลีนออก จากนั้นทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนของพลาสมิด pPICZαA / *Pst I* ตามวิธี E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit จากนั้นทำให้เกิดการเชื่อมตัวเอง (self-ligation) ด้วยเอนไซม์ไลเกสเพื่อให้ได้เป็นพลาสมิด pPICZαA :: CA และนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* TOP 10 F' ตามวิธีของ (Evans, 1990) และคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนของ *E. coli*

ที่รับพลาสมิดเข้าไปบนอาหาร LB Zeocin™ จากนั้นทำการสกัดและทำบริสุทธิ์พลาสมิด pPICZαA :: CA ตามวิธีของ (Evans, 1990) และส่งวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัทมาโครเจน (Macrogen) โดยใช้ไพรเมอร์ 5’AOX

3.2.2 สร้างรีคอมบิแนนต์ยีสต์ *P. pastoris* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนซีโครปิน เอ

3.2.2.1 การเตรียมยีสต์เพื่อรับพลาสมิด

นำยีสต์ *P. pastoris* ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ X-33, GS115 และ KM71H มาเลี้ยงในอาหาร YPD (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำหัวเชื้อยีสต์ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร YPD บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 จากนั้น ทำการเก็บเซลล์ทั้งหมดด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น เทส่วนใสที่ได้ออกและเติมอาหาร YPD ลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ เติมบัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ เอชอีพีอีเอส (HEPES) ค่ากรด – ด่างที่ 8 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และเติม 1 โมลาร์ ไดไทโอเทียรทอล (DTT) 250 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น เก็บตะกอนทั้งหมดด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน ทำซ้ำในขั้นนี้ 1 รอบ จากนั้น เติม 1 โมลาร์ ซอร์บิทอร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนใสทิ้ง จากนั้น เติม 1 โมลาร์ ซอร์บิทอร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และแบ่งออกใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเก็บไว้ในที่เย็นเพื่อเตรียมนำพลาสมิดที่ต้องการเข้าสู่ยีสต์

3.2.2.2 นำพลาสมิดเข้าสู่ยีสต์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโพเรชัน (Electroporation)

นำพลาสมิดที่ได้จาก 3.2.1 และยีสต์ที่ได้จาก 3.2.2.1 มาผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต จากนั้นนำยีสต์และพลาสมิดที่ผสมเข้ากันแล้วไปใส่ในคิวเวตต์ขนาด 0.2 เซนติเมตร จากนั้นนำคิวเวตต์ไปใส่ในเครื่อง ส่งถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (MicroPulser™ Electroporator) ให้กระแสไฟฟ้า 2.5 กิโลโวลต์ เวลา 4.20 ถึง 4.70 วินาที จากนั้นนำรีคอมบิแนนต์ที่ได้มาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ และเติม 1 โมลาร์ ซอร์บิทอร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นทำการแช่เย็นเป็นเวลา 30 นาที ทำการบ่มรีคอมบิแนนต์ที่ได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหาร YPD 500 ไมโครลิตรและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำมากระจายบนอาหารวุ้น YPD ที่มี Zeocin ™ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-4 วัน จนเกิดโคโลนีของรีคอมบิแนนต์ยีสต์

3.2.2.3 การเลี้ยง และ การหาภาวะที่เหมาะสมในการการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน ซีโครปิน เอ ใน P. pastoris

นำโคโลนีของรีคอมบิแนนต์ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPGly (ภาคผนวก) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในอาหาร YPGly อีกครั้ง เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์โดยปรับปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์ในแต่ละสายพันธุ์ให้ได้ ค่าการดูดกลืนแสง 600 มีค่าประมาณ 1 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเพื่อเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีนซีโครปิน เอ โดยเริ่มจากเก็บเกี่ยวเซลล์ทั้งหมดมากระจายในอาหาร Buffered methanol complex medium (BMMY) (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีเมธานอลเป็นองค์ประกอบ โดยอาหาร BMMY นี้จะเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน โดยประกอบด้วยปัจจัยต่างๆ

ประกอบด้วย อุณหภูมิ 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส, ค่ากรด - ด่างที่ 4 - 7 และความเข้มข้นของเมทานอล 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการเลี้ยงในแต่ละภาวะทำการปั่นแยกตะกอนเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อและทำการศึกษาการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน (gene expression) โดยจากส่วนตะกอนเซลล์และแยกซีโครปิน เอ จากอาหารเลี้ยงเชื้อ และวัดปริมาณโปรตีนซีโครปิน เอ ที่ผลิตได้

3.2.3 การตรวจสอบระดับการแสดงของยีน (gene expression) ซีโครปิน เอ ในรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ด้วยวิธี Real time PCR (qPCR)

โดยเริ่มจากการสกัดอาร์เอ็นเอจากตะกอนเซลล์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกที่ภาวะต่างๆ และทำการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็นซีดีเอ็นเอ และนำซีดีเอ็นเอที่ได้ใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการทำปฏิกิริยาเพื่อติดตามการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ด้วยวิธี โดยใช้ยีนแอคติน (Actin gene) เป็นยีนอ้างอิง

3.2.3.1 วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุด Yeast RNA Kit

นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับเอสอี/2 เมอร์แคปโตแอททานอล (SE/2 mercaptoethanol) 480 ไมโครลิตร และ ไลติเคส (lyticase) 40 ไมโครลิตร จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเครื่องผสมสารละลาย เป็นเวลา 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการปั่นตกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการแยกส่วนใสทิ้ง และนำตะกอนเซลล์มาผสมกับ วายอาร์แอล / 2 เมอร์แคปโตแอทานอล (YRL/2 mercaptoethanol) 350 ไมโครลิตร และ Glass bead 50 มิลลิกรัม ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex) เป็นเวลา 5 นาที ปั่นตกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้จากการ

แยกมาใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ เติม 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเครื่องผสมสารละลาย เป็นเวลา 15 วินาที แยกของเหลวทั้งหมดลงในคอลัมน์ ปั่นตกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทำการล้างด้วย RNA wash buffer I 500 ไมโครลิตร ปั่นตกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที นำส่วนใสทิ้งและล้างด้วย RNA wash buffer II 500 ไมโครลิตร อีก 2 รอบ โดยรอบที่ 2 ทำการปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำคอลัมน์ใส่ลงไปในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ชะนำอาร์เอ็นเอออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำ DEPC treated ปริมาตร 60 ไมโครลิตร นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพ และ ปริมาณด้วยเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer) และ นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปเก็บที่ – 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ หรือนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปเปลี่ยนให้เป็นซีดีเอ็น

3.2.3.2 วิธีการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นซีดีเอ็นเอด้วยชุด Tetro Reverse Transcription

นำสารละลายชุด Tetro Reverse Transcription มาทำละลายและทำให้เข้ากันก่อนการใช้งาน จากนั้นเตรียมส่วนประกอบในการทำซีเอ็นเอตามตารางที่ 3.1 ดังนี้

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของสารละลาย Tetro Reverse Transcription

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอ	2
10 มิลลิโมลาร์ dNTP mix	1
Oligo (dT) 18 (10 ไมโครโมลาร์)	1
5x RT Buffer	4
Ribosafe RNase Inhibitor	1
Tetro Reverse Transcriptase	1
DEPC-treated water	10

ปริมาณการใช้อาร์เอ็นในแต่ละตัวอย่างจะถูกคำนวณให้มีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอเริ่มต้นเท่ากันที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมาใช้ ผสมส่วนประกอบดังกล่าวเข้าด้วยกันจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำมาบ่มที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำตัวอย่างที่ได้เก็บไว้ที่ – 20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้เป็นต้นแบบที่จะใช้ปฏิกิริยา Real time PCR

3.2.3.3 ปฏิกิริยา Real time PCR

การตรวจหายีนซีโครปิน เอ ด้วยวิธี Real time qPCR ใช้น้ำยาสำเร็จรูป Evagreen® ด้วยเครื่อง Real time qPCR (Bio-Rad, CA, USA) ใช้ไพรเมอร์ CA F, CA R และ Actin F, Actin R ตามตารางที่ 3.2 เพื่อติดตามการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ โดยใช้ยีนแอคติน (Actin gene) เป็นยีนอ้างอิง ในการตรวจหาปริมาณยีนจะเริ่มด้วยในขั้นตอนต่างๆ การผสมส่วนประกอบของสารละลาย

ในตารางที่ 3.3 นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยแต่ละรอบ (cycle) จะประกอบด้วย ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 20 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 20 วินาที จำนวนทั้งหมด 40 รอบ โดยใช้ยีนแอคติน (Actin gene) เป็นยีนอ้างอิง ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ใน Real time PCR

Name	Sequence (5’ → 3’)
Actin F	GGTATTGCTGAGCGTATGCAAA
Actin R	CCACCGATCCATACGGAGTACT
CA F	GACTGGTTCCAATTGACAAG
CA R	CTTAGCGATCTGGGTCGCCTG

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของสารละลายใน Real time PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ซีดีเอ็นเอ	2
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus	5
ไพรเมอร์ forward (10 พิคโคโมลต่อไมโครลิตร)	1
ไพรเมอร์ Reward (10 พิคโคโมลต่อไมโครลิตร)	1
น้ำพีซีอาร์	16
ปริมาตรทั้งหมด	25

3.2.4 การทำบริสุทธิ์ซีโครปิน เอ ด้วยคอลัมน์ His trap FF Affinity Chromatography

นำส่วนใสที่ได้มาจากการเลี้ยงเชื้อแล้วนั้น นำมากรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 ไมครอน จากนั้นผสมส่วนใสกับ binding buffer (20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, 20 มิลลิโมลาร์ Imidazole, 500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์) อัตราส่วน 1:1 ส่งผ่านคอลัมน์ His trap ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย binding buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (10 เท่าของปริมาณคอลัมน์) และทำการชะด้วย elution buffer (20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, 500 มิลลิโมลาร์ Imidazole, 500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์) เก็บตัวอย่างพีคที่เกิดขึ้นเพื่อไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในขั้นตอนต่อไป และบ่งชี้ด้วยหลักการภูมิคุ้มกัน (Dot blot analysis) กับ anti his tag

CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.2.5 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic acid assay (BCA)

เตรียมโปรตีน Bovine serum albumin (โปรตีนที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียมสารละลาย A : B (Working reagent : WR) ในอัตราส่วน 50 : 1 เป็นสารละลาย ผสมสารละลาย WR กับสารละลาย Bovine serum albumin ในอัตราส่วน 1 : 8 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร และ ทำกราฟมาตรฐานโปรตีนที่ความเข้มข้น 0 ถึง 500 ไมโครกรัม และใช้กราฟมาตรฐานในการคำนวณปริมาณโปรตีนของตัวอย่างต่อไป

3.2.6 การตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการภูมิคุ้มกัน (Dot blot analysis)

นำรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ จาก 3.2.5 และ ใช้ตัวควบคุม คือ ตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) คือ รีคอมบิแนนต์ของชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยวที่ต่อด้วยฮิทธิดีน (Single Chain Variable Fragment : scFv – his tag) ตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ, binding buffer และ elution buffer มาหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสปริมาตร 3 ไมโครลิตร จากนั้นนำแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หรือ ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และนำแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่แห้งแล้วมาแช่ลงใน 0.25 เปอร์เซ็นต์ กลูตารอลดีไฮด์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างกระดาษด้วยน้ำกลั่น เป็นจำนวน 5 ครั้ง และแช่ใน 5 เปอร์เซ็นต์ ของนมผงขาดมันเนย (นมผงขาดมันเนยกระจายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และล้างกระดาษด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ทวีน เป็นจำนวน 5 ครั้ง หลังจากนั้นบ่มในแอนติบอดี้ที่มีฮิสธิดีนต่อด้วยฮอร์เซอราดิสเปอร์ออกซิเดส (Anti-His (C - term) - HRP) เจือจาง 1 ต่อ 1000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างกระดาษด้วยฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ซาลีน ทวีน (PBST) เป็นจำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายซับสเตรตที่ประกอบด้วย 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไดอะมิโนเบนซิดีน (Diaminobenzidine : DAB), 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide : H_2O_2) และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ โคบอลต์คลอไรด์ (Cobalt chloride : $CoCl_2$) ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที จะสังเกตเห็นจุดสีดำที่บริเวณกระดาษให้หยุดปฏิกิริยาโดยน้ำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นจำนวน 5 ครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4

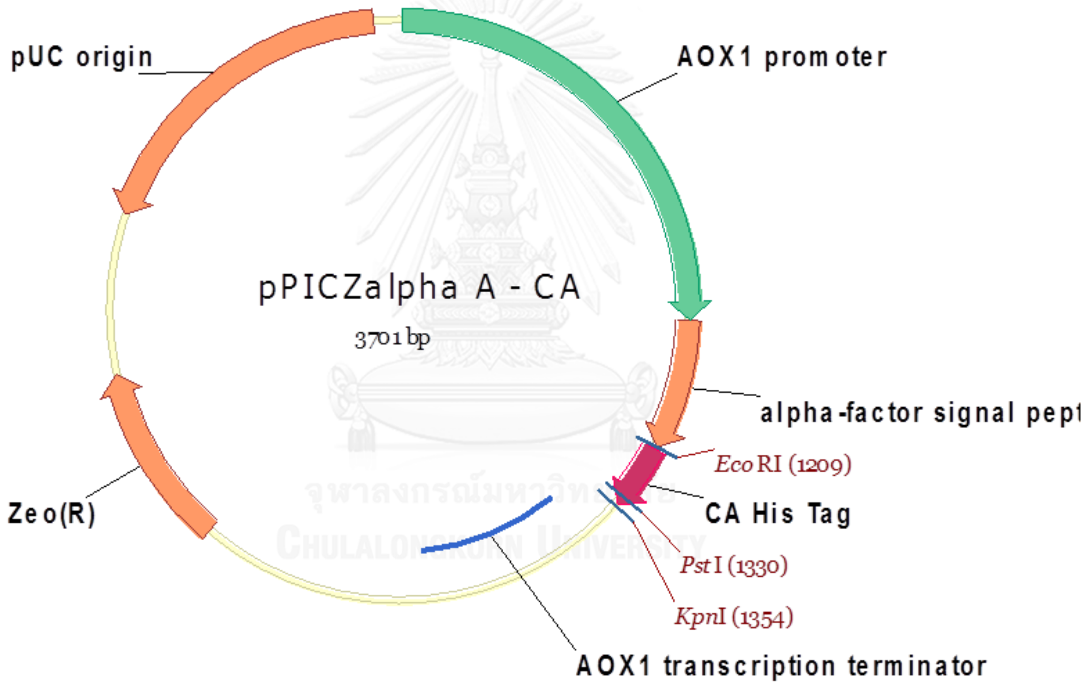
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตซีโครปิน เอ โดยการนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีนซีโครปิน เอ (pPICZαA:: CA) เข้าสู่ *P. pastoris* 3 สายพันธุ์ คือ GS115 (Mut$^+$, his$^-$), X-33 (Mut$^+$, WT) และ KM71H (Mut^S) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโพเรชัน (Electroporation) และยืนยันผลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนซีโครปิน เอ ที่เข้าสู่ *P. pastoris* 3 สายพันธุ์ แล้วทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตด้วย 2 วิธี คือ วิธีแรก ตรวจสอบระดับการแสดงออก (gene expression) ของยีนรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ในยีสต์ *P. pastoris* และวิธีที่สองการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ด้วยคอลัมน์ His trap FF Affinity Chromatography โดยยืนยันผลด้วยหลักการภูมิคุ้มกัน (Dot blot analysis) และ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ได้ด้วย BCA

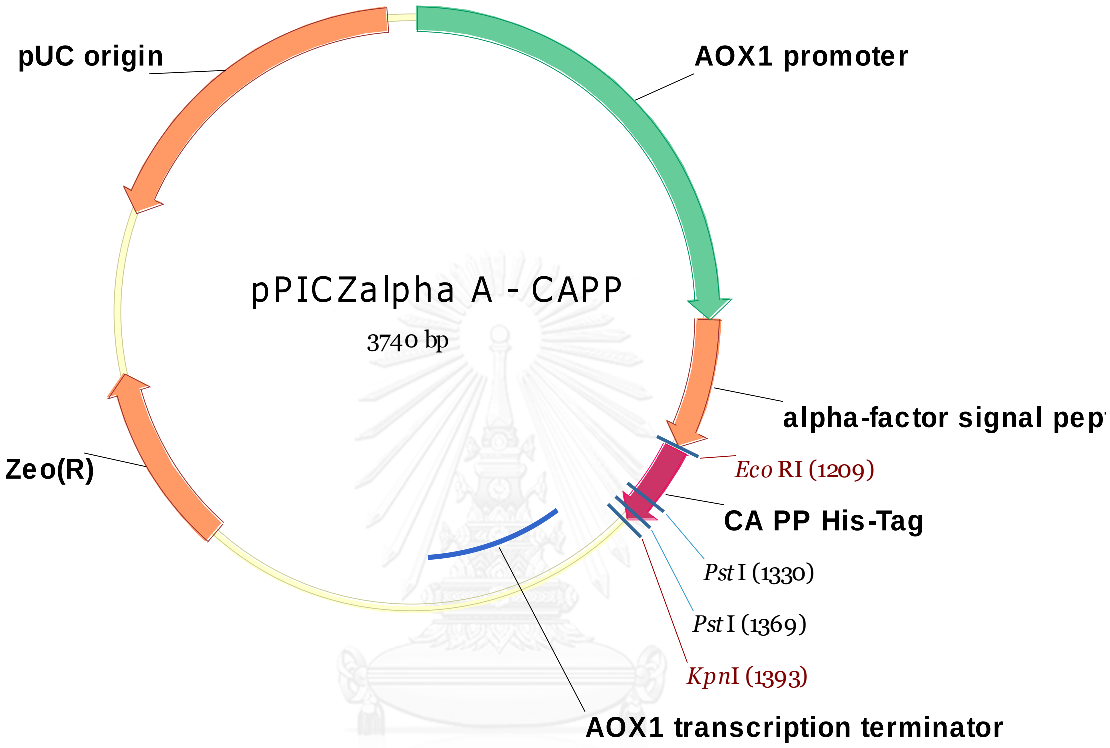
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.1 สร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีนซีโครปิน เอ อยู่บนพาหะดีเอ็นเอ pPICZαA

พลาสมิด pPICZαA :: CA ขนาด 3704 คู่เบส ดังรูป 4.1 ที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนของโพลีโพลีน ออกจากพลาสมิด pPICZαA :: CAPP (รูปที่ 4.2) ตามวิธีข้อ 3.2.1 และนำส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนแสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.1 แผนที่ทางพันธุกรรมพลาสมิดรีคอมบิแนนต์ pPICZαA :: CA His-Tag



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

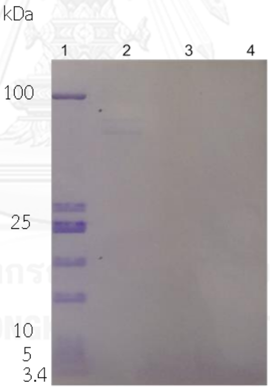
รูปที่ 4.2 แผนที่ทางพันธุกรรมของพลาสมิดรีคอมบิแนนต์ pPICZαA :: CAPP His-Tag

```
ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA
 M   R   F   P   S   I   F   T   A   V   L   F   A   A

TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT
 S   S   A   L   A   A   P   V   N   T   T   T   E   D

GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA
 E   T   A   Q   I   P   A   E   A   V   I   G   Y   S
                       α-factor signal
GAT TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC
 D   L   E   G   D   F   D   V   A   V   L   P   F   S

AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT
 N   S   T   N   N   G   L   L   F   I   N   I   I   I

GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA
 A   S   I   A   A   K   E   E   G   V   S   L   E   K
                        EcoRI
AGA GAG GCT GAA GCT GAA TTC AAG TGG AAG CTG TTC AAG AAG
 R   E   A   E   A   E   F   K   W   K   L   F   K   K
                          Cecropin A
ATC GAG AAG GTC GGC CAG AAC ATC CGC GAT GGC ATC ATC AAG
 I   E   K   V   G   Q   N   I   R   D   G   I   I   K

GCT GGT CCG GCT GTC GCA GTC GTC GGC CAG GCG ACC CAG ATC
 A   G   P   A   V   A   V   V   G   Q   A   T   Q   I
          PstI            6 x his tag        STOP
GCT AAG CTG CAG CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA TCG GTA CCT
 A   K   L   Q   H   H   H   H   H   H  STOP S   V   P
CGA GCC GCG GCG GCG GCG AGC TTT CTA GAA CAA AAA CTC ATC
 R   A   A   A   A   A   S   F   L   E   Q   K   L   I
TCA GAA GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT
 S   E   E   D   L   N   S   A   V   D   H   H   H   H
CAT CAT TGA
 H   H  STOP
```

รูปที่ 4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ ลำดับกรดอะมิโน ของซีโครปิน เอ ใน pPICZαA :: CA

4.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris*

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* ด้วยการวิเคราะห์การแยกโปรตีนโดยเจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่า ไม่สามารถมองเห็นรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ได้ (รูปที่ 4.4) เนื่องจากรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ที่ผลิตได้นั้น มีความเข้มข้นน้อยเกินไป จึงไม่สามารถวิเคราะห์หรือเปรียบเทียบผลได้ด้วยวิธีนี้ได้ โดยได้ทำการทดลองการแยกโปรตีนมาตรฐานซีโครปิน เอ ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ตั้งแต่ 0.0078 - 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ถ้าความเข้มข้นของซีโครปิน เอ น้อยกว่า 0.0156 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังภาคผนวก ง – 1) นั้นไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธีนี้



รูปที่ 4.4 ผลเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (SDS-PAGE) ของส่วนใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ค่ากรด – ด่างที่ 6 อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ หมายเหตุ : แถบที่ 1 = ขนาดโมเลกุลมาตรฐาน

แถบที่ 2 = *P. pastoris* X33 ชั่วโมงที่ 24

แถบที่ 3 = *P. pastoris* GS115 ชั่วโมงที่ 24

แถบที่ 4 = *P. pastoris* KM71H ชั่วโมงที่ 24

การตรวจสอบปริมาณรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโพรีซีสจะต้องมีความเข้มข้นของโปรตีนที่ต่ำสุดอยู่ที่ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Weiss et al., 2009) ซึ่งจากการทดลองได้ทำการตรวจสอบความเข้มข้นของซีโครปิน เอ มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนระหว่าง 0.0156 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการศึกษาครั้งนี้จึงไม่สามารถตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เนื่องจากความเข้มข้นรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ที่ได้นั้นมีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงไม่สามารถตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ได้

ดังนั้น จึงแก้ปัญหาด้วยการศึกษาระดับการแสดงออกของซีโครปิน เอ ด้วยเทคนิค Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR) ซึ่งตามปกติแล้ว ยีนที่มีการแสดงออกมากจะมีปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนนั้นมาก เมื่อมีปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอมากก็จะมีการผลิตโปรตีนที่มากไปด้วย เนื่องจาก ซีโครปิน เอ เป็นเพปไทด์สายสั้นและไม่มีกระบวนการหลังการแปลรหัส (post translation) ดังนั้น ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอที่ได้จะสอดคล้องกันกับปริมาณของโปรตีนที่ผลิตได้ ความแตกต่างระดับการแสดงออกของซีโครปิน เอ หลังจากมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วยเมทานอลในชั่วโมงที่ 24 ในปัจจัยต่างๆ ประกอบด้วย อุณหภูมิ 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส ค่ากรด - ด่างที่ 4 ถึง 7 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ นำซีดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดอาร์เอ็นเอและทำการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ อาร์เอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Nanodrop 2000) พบว่า ปริมาณอาร์เอ็นเอของการผลิตรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ของค่ากรด - ด่างที่ 4 ถึง 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ อยู่ระหว่าง 48.36 ถึง 785.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

ปริมาณอาร์เอ็นเอของการผลิตรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ของอุณหภูมิ 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส ค่ากรด - ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ อยู่ระหว่าง 284.2

ถึง 739.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และปริมาณอาร์เอ็นเอของการผลิตรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอของความเข้มข้นของเมทานอล 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่ากรด - ด่าง ที่ 6 อยู่ระหว่าง 34 ถึง 902.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค) จากนั้น ปรับความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอให้เท่ากันและใช้อาร์เอ็นเอที่ได้เปลี่ยนให้เป็นซีดีเอ็นเอวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Real Time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อซีโครปิน เอ ตารางที่ 3.1

ในการทดลองนี้ใช้ยีนอ้างอิง คือ ยีนแอคติน ซึ่งเป็น housekeeping gene โดยยีนนี้มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในขณะที่ยีสต์ยังดำรงชีวิตอยู่ (Guerfal et al., 2010) และ วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Real Time PCR เพื่อศึกษาความแตกต่างระดับการแสดงออกของซีโครปิน เอ หลังจากการวิเคราะห์โดย Real Time PCR สิ้นสุดลง การแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้โปรแกรม CFX Manager™ ในการคำนวณหาระดับการแสดงออกในแต่ละปัจจัยตรวจสอบโดยคำนวณจากค่า quantification cycle (Cq) จากยีนแอคติน โดยใช้ alpha a เป็นตัวควบคุม โดยระดับการแสดงออกของซีโครปิน เอ ในปัจจัยต่างๆ

ระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ในยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ X33, GS115 และ KM71H ที่ค่ากรด-ด่างเท่ากับ 4 อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีระดับการแสดงออกที่ใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงระหว่าง 2.1×10^4 เท่า ถึง 2.3×10^4 เท่า ดังตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.5

ระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ในยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ X33, GS115 และ KM71H ที่ค่ากรด-ด่างเท่ากับ 5 อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์นั้น พบว่า มีระดับการแสดงออกเท่ากับ 7.4×10^1, 7.39×10^4 และ 1.72×10^4 เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.6

ระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ในยีสต์ P. pastoris สายพันธุ์ X33, GS115 และ KM71H ที่ค่ากรด-ด่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีระดับการแสดงออกเท่ากับ 4.35×10^{3}, 3.32×10^{5} และ 7.62×10^{5} เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.3 และ รูปที่ 4.7

ระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ในยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ X33, GS115 และ KM71H ค่ากรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีระดับการแสดงออกเท่ากับ 1.01×10^{2}, 6.69×10^{3} และ 2.15×10^{3} เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.8

จากการศึกษาผลของค่ากรด-ด่างต่อการผลิตซีโครปิน เอ จะพบว่า ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ KM71H มีระดับการแสดงออกที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่น และ ทุกสายพันธุ์มีการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ที่ดีที่สุด ที่ภาวะค่ากรด-ด่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

ระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ในยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ X33, GS115 และ KM71H อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ค่ากรด-ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีระดับการแสดงออกเท่ากับ 4.05×10^{3}, 3.65×10^{4} และ 1.29×10^{5} เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5 และ รูปที่ 4.9

ระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ในยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ X33, GS115 และ KM71H อุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ค่ากรด-ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีระดับการแสดงออกเท่ากับ 1.64×10^{4}, 3.09×10^{4} 7.33×10^{5} เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.6 และ ดังรูปที่ 4.10

ระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ในยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ X33, GS115 และ KM71H อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่ากรด-ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีระดับการแสดงออกเท่ากับ 3.82x10^{6}, 7.5910^{6} และ 2.56x10^{7} เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.7 และ รูปที่ 4.11

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตซีโครปิน เอ จะพบว่า ระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ KM71H ที่เลี้ยงในทุกอุณหภูมิ (25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส) ค่ากรด-ด่างเท่ากับ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีระดับการแสดงออกที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่น และ ทุกสายพันธุ์มีการแสดงออกของซีโครปิน เอ ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่ากรด-ด่างเท่ากับ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

ระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ในยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ X33, GS115 และ KM71H ในระดับความเข้มข้นของเมทานอลที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ค่ากรด-ด่างที่ 6 อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสพบว่า มีระดับการแสดงออกเท่ากับ 4.42x10^{6}, 7.90 x10^{6} และ 2.25x10^{8} เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.8 และ รูปที่ 4.12

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ในยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ X33, GS115 และ KM71H ระดับความเข้มข้นของเมทานอลที่ 1 เปอร์เซ็นต์ ค่ากรด-ด่างที่ 6 อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่า มีระดับการแสดงออกเท่ากับ 7.27x10^{3} , 1.65 x10^{5} และ 2.22x10^{5} เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.9 และ รูปที่ 4.13

ระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ในยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ X33, GS115 และ KM71H ระดับความเข้มข้นของเมทานอลที่ 2 เปอร์เซ็นต์ ค่ากรด-ด่างที่ 6 อุณหภูมิที่ 30 องศา

เซลเซียส พบว่า มีระดับการแสดงออกเท่ากับ 7.65×10^3, 9.07×10^4 และ 1.36×10^5 เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.10 และ รูปที่ 4.14

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตซีโครปิน เอ จะพบว่า ระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ KM71H ที่เลี้ยงในทุกความเข้มข้นของเมทานอล (0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์) ค่ากรด-ด่างเท่ากับ 6 และ อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส มีระดับการแสดงออกที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่น และ ทุกสายพันธุ์มีการแสดงออกของซีโครปิน เอ ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่ากรด-ด่างเท่ากับ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

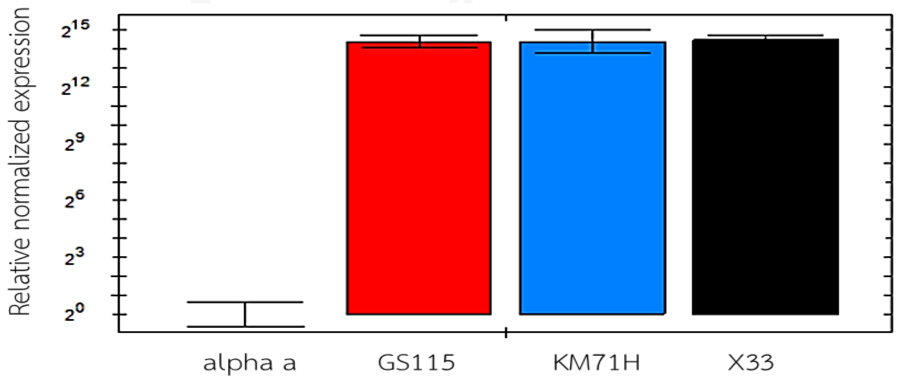
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2.2 ตรวจสอบการผลิตตรีคอมบิแนนต์โปรตีนซีโครปิน เอ และ ศึกษาระดับการแสดงออกด้วยเทคนิค Real time PCR

ตารางที่ 4.1 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

Target	Sample	Mean Cq	Normalized Expression	Relative Normalized Expression	Compared to Regulation Threshold	P-Value
Actin	alpha a	18.34	-	-	No change	-
Actin	GS115	17.63	-	-	No change	0.990705
Actin	KM71H	18.83	-	-	No change	0.951980
Actin	X33	17.28	-	-	No change	0.991720
CA	alpha a	35.89	0.00001	1.00000	No change	-
CA	GS115	20.77	0.11358	21734.21384	Up regulated	0.055756
CA	KM71H	21.96	0.11414	21841.07338	Up regulated	0.172724
CA	X33	20.31	0.12270	23479.11584	Up regulated	0.025047

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม CFX Manager™ , alpha a คือ *P. pastoris* ที่รับเฉพาะเวคเตอร์ pPICZ α A เข้าไปในจีโนม

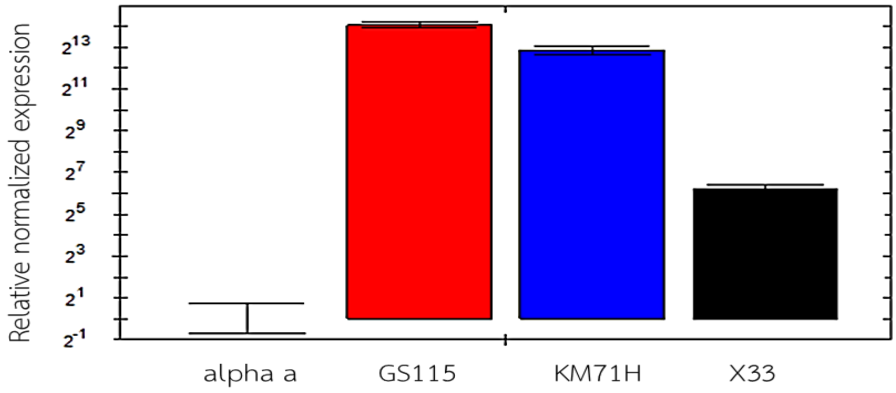


รูปที่ 4.5 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่าง 4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.2 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

Target	Sample	Mean Cq	Normalized Expression	Relative Normalized Expression	Compared to Regulation Threshold	P-Value
Actin	alpha a	30.06	-	-	No change	-
Actin	GS115	30.72	-	-	No change	0.629356
Actin	KM71H	30.50	-	-	No change	0.635598
Actin	X33	31.71	-	-	No change	0.632366
CA	alpha a	32.56	0.17658	1.00000	No change	-
CA	GS115	19.15	3039.86878	17215.31006	Up regulated	0.000135
CA	KM71H	20.15	1306.64267	7399.74660	Up regulated	0.000817
CA	X33	27.98	13.23956	74.97793	Up regulated	0.000038

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม CFX Manager™ , alpha a คือ *P. pastoris* ที่รับเฉพาะเวคเตอร์ pPICZ α A เข้าไปในจีโนม

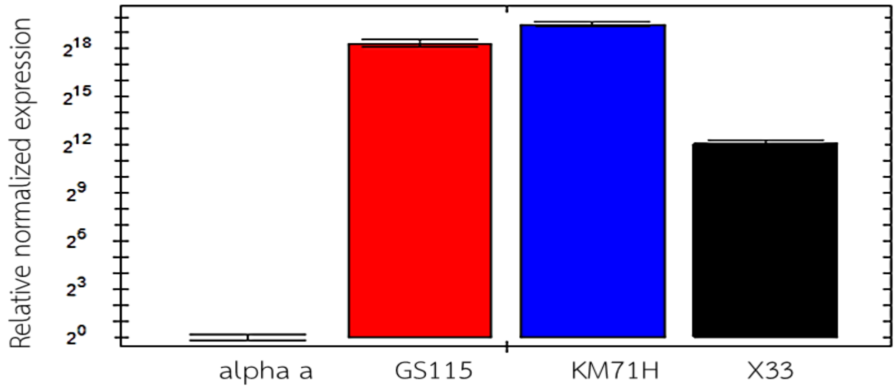


รูปที่ 4.6 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.3 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

Target	Sample	Mean Cq	Normalized Expression	Relative Normalized Expression	Compared to Regulation Threshold	P-Value
Actin	alpha	20.63	-	-	No change	-
Actin	GS115	20.17	-	-	No change	0.912622
Actin	KM71H	20.69	-	-	No change	0.954074
Actin	X33	20.21	-	-	No change	0.901646
CA	alpha	36.94	0.00001	1.00000	No change	-
CA	GS115	18.14	4.08630	331679.07657	Up regulated	0.000020
CA	KM71H	17.46	9.39175	762315.03556	Up regulated	0.000006
CA	X33	24.43	0.05355	4346.56258	Up regulated	0.000013

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม CFX Manager™ , alpha a คือ *P. pastoris* ที่รับเฉพาะเวคเตอร์ pPICZ α A เข้าไปในจีโนม

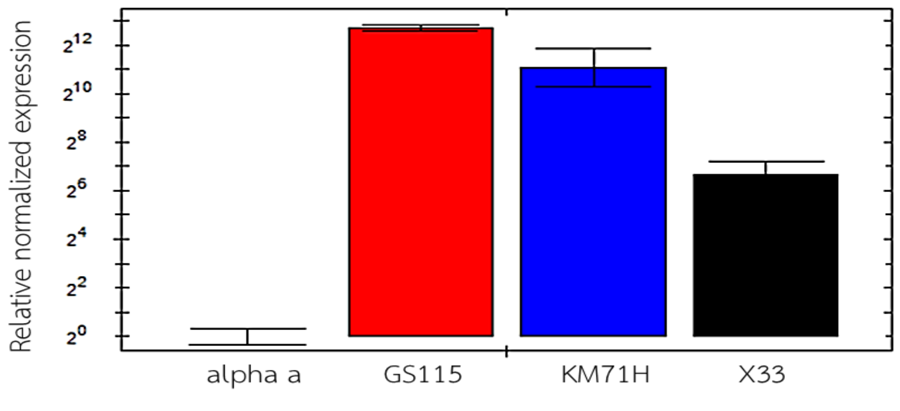


รูปที่ 4.7 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.4 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

Target	Sample	Mean Cq	Normalized Expression	Relative Normalized Expression	Compared to Regulation Threshold	P-Value
Actin	alpha	20.85	-	-	No change	-
Actin	GS115	31.59	-	-	No change	0.817944
Actin	KM71H	23.52	-	-	No change	0.627190
Actin	X33	33.07	-	-	No change	0.980111
CA	alpha	33.83	0.00012	1.00000	No change	-
CA	GS115	31.86	0.82842	6693.26142	Up regulated	0.000014
CA	KM71H	25.43	0.26559	2145.87825	Up regulated	0.001091
CA	X33	39.38	0.01258	101.64059	Up regulated	0.000001

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม CFX Manager™ , alpha a คือ *P. pastoris* ที่รับเฉพาะเวคเตอร์ pPICZ α A เข้าไปในจีโนม

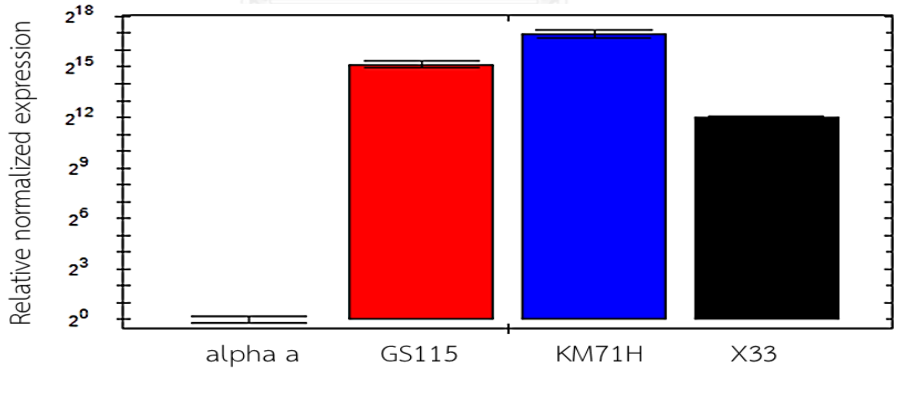


รูปที่ 4.8 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.5 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

Target	Sample	Mean Cq	Normalized Expression	Relative Normalized Expression	Compared to Regulation Threshold	P-Value
Actin	alpha a25 C	20.87	-	-	No change	-
Actin	GS115	21.56	-	-	No change	0.958497
Actin	KM71H	21.65	-	-	No change	0.996419
Actin	X33	20.17	-	-	No change	0.888486
CA	alpha a25 C	31.02	0.00088	1.00000	No change	-
CA	GS115	16.56	32.11492	36456.50546	Up regulated	0.001028
CA	KM71H	14.82	113.63312	128995.08825	Up regulated	0.000285
CA	X33	18.34	3.56366	4045.42500	Up regulated	0.000391

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม CFX Manager™ , alpha a คือ *P. pastoris* ที่รับเฉพาะเวคเตอร์ pPICZ α A เข้าไปในจีโนม

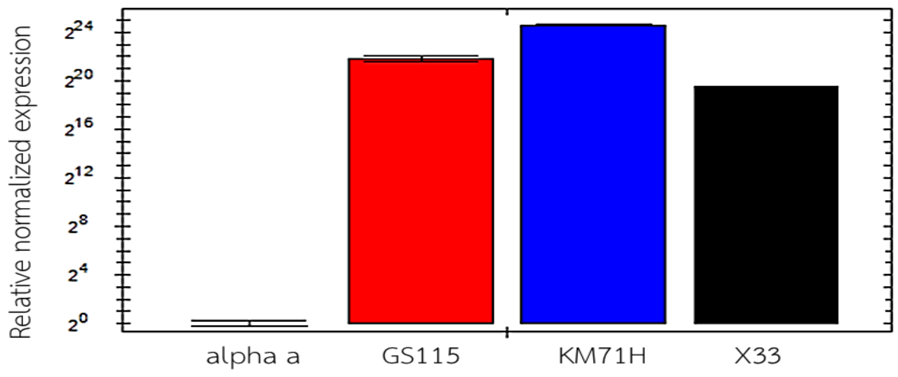


รูปที่ 4.9 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.6 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

Target	Sample	Mean Cq	Normalized Expression	Relative Normalized Expression	Compared to Regulation Threshold	P-Value
Actin	alpha a	21.64	-	-	No change	-
Actin	GS115	20.40	-	-	No change	0.997827
Actin	KM71H	22.52	-	-	No change	0.930535
Actin	X33	20.48	-	-	No change	0.872836
CA	alpha a	33.75	0.00023	1.00000	No change	-
CA	GS115	17.59	6.97548	30923.78138	Up regulated	0.004356
CA	KM71H	15.15	165.42770	733375.83777	Up regulated	0.000435
CA	X33	18.59	3.69830	16395.35705	Up regulated	0.000332

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม CFX Manager™ , alpha a คือ *P. pastoris* ที่รับเฉพาะเวคเตอร์ pPICZ α A เข้าไปในจีโนม

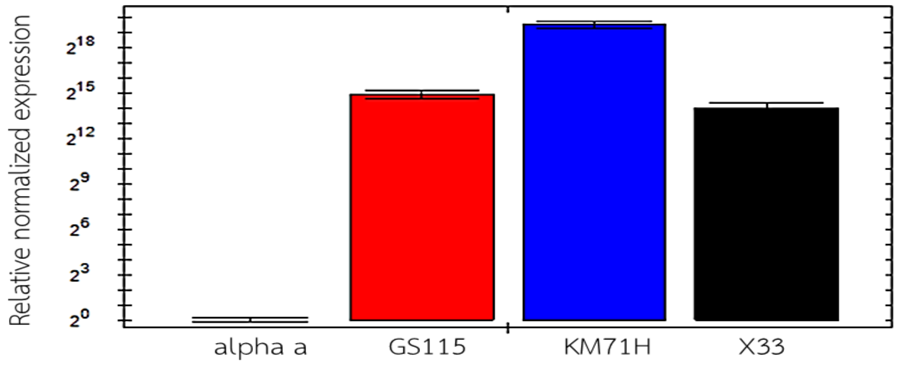


รูปที่ 4.10 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.7 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

Target	Sample	Mean Cq	Normalized Expression	Relative Normalized Expression	Compared to Regulation Threshold	P-Value
Actin	alpha a	20.36	-	-	No change	-
Actin	GS115	19.86	-	-	No change	0.899223
Actin	KM71H	21.57	-	-	No change	0.912246
Actin	X33	20.53	-	-	No change	0.985955
CA	alpha a	38.25	0.00000	1.00000	No change	-
CA	GS115	18.22	3.11447	758728.30864	Up regulated	0.000007
CA	KM71H	14.85	105.01173	25582292.99972	Up regulated	0.000003
CA	X33	16.56	15.70034	3824816.52171	Up regulated	0.000299

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม CFX Manager™ , alpha a คือ *P. pastoris* ที่รับเฉพาะเวคเตอร์ pPICZ α A เข้าไปในจีโนม

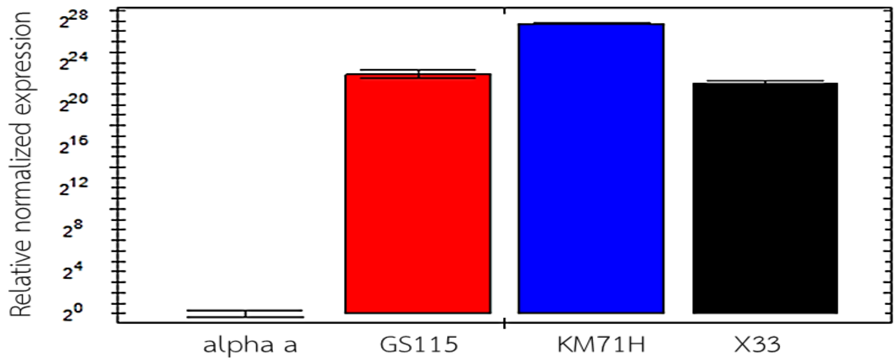


รูปที่ 4.11 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่มีค่ากรด - ด่างที่ 6 และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.8 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ มีค่ากรด - ด่างที่ 6

Target	Sample	Mean Cq	Mean Efficiency Corrected Cq	Normalized Expression	Relative Normalized Expression	Regulation	Compared to Regulation Threshold
Actin	alpha a	17.55	17.55	-	-	-	No change
Actin	GS115	17.06	17.06	-	-	-	No change
Actin	KM71H	18.82	18.82	-	-	-	No change
Actin	X33	16.77	16.77	-	-	-	No change
CA	alpha a	38.62	38.62	0.00	1.00	1.00	No change
CA	GS115	15.22	15.22	3.58	7895422.06	7895422.06	Up regulated
CA	KM71H	12.15	12.15	102.16	225104261.87	225104261.87	Up regulated
CA	X33	15.77	15.77	2.01	4420921.71	4420921.71	Up regulated

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม CFX Manager™ , alpha a คือ *P. pastoris* ที่รับเฉพาะเวคเตอร์ pPICZ α A เข้าไปในจีโนม

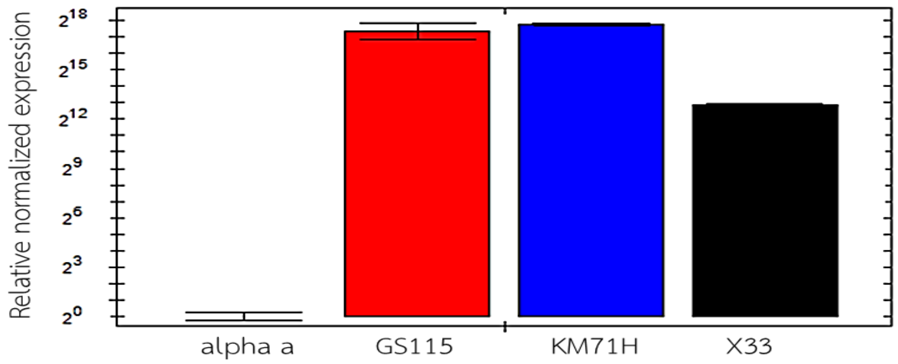


รูปที่ 4.12 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ มีค่ากรด - ด่างที่ 6

ตารางที่ 4.9 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ มีค่ากรด - ด่าง ที่ 6

Target	Sample	Mean Cq	Normalized Expression	Relative Normalized Expression	Compared to Regulation Threshold	P-Value
Actin	alpha	18.34	-	-	No change	-
Actin	GS115	19.17	-	-	No change	0.988530
Actin	KM71H	18.27	-	-	No change	0.949379
Actin	X33	17.63	-	-	No change	0.983118
CA	alpha	38.63	0.00000	1.00000	No change	-
CA	GS115	22.13	0.12865	164539.79875	Up regulated	0.075588
CA	KM71H	20.80	0.17320	221508.76741	Up regulated	0.000033
CA	X33	25.09	0.00569	7274.01177	Up regulated	0.000000

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม CFX Manager™ , alpha a คือ *P. pastoris* ที่รับเฉพาะเวคเตอร์ pPICZ α A เข้าไปในจีโนม

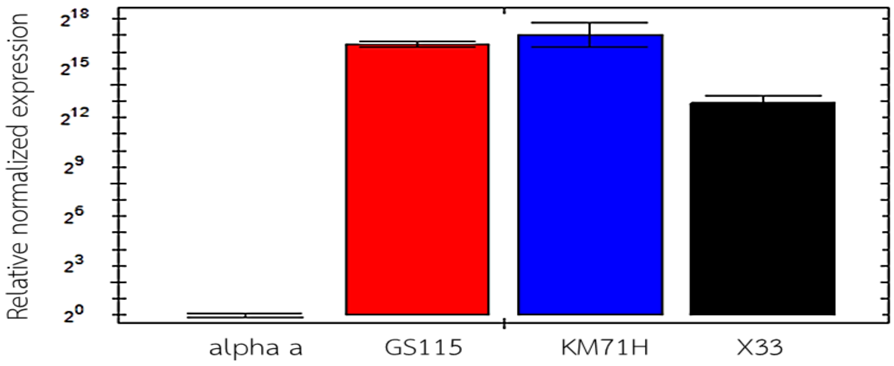


รูปที่ 4.13 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ มีค่ากรด - ด่าง ที่ 6

ตารางที่ 4.10 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ มีค่ากรด - ด่าง ที่ 6

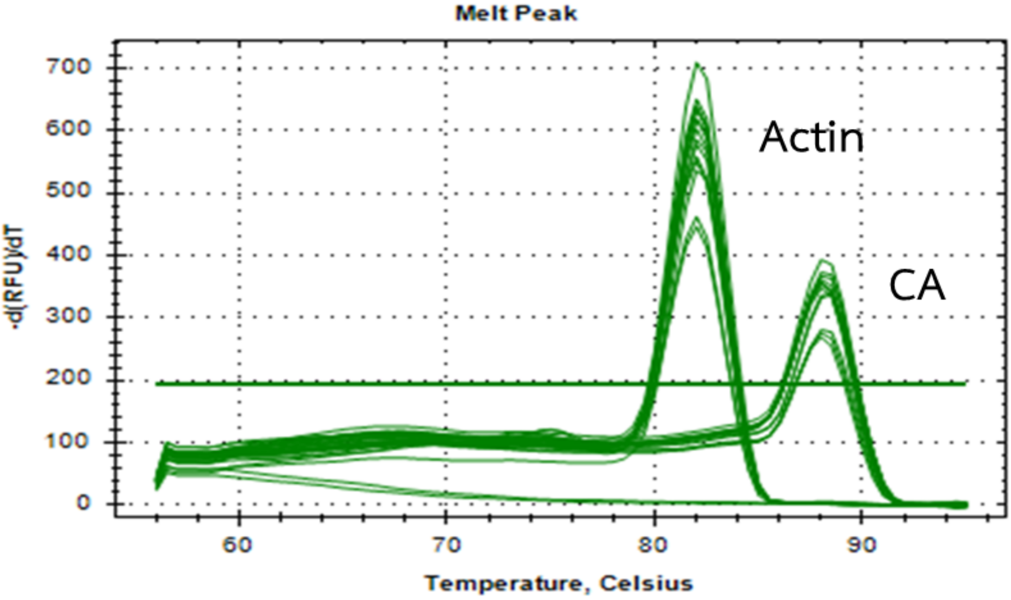
Target	Sample	Mean Cq	Normalized Expression	Relative Normalized Expression	Compared to Regulation Threshold	P-Value
Actin	alpha	18.65	-	-	No change	-
Actin	GS115	19.16	-	-	No change	0.981078
Actin	KM71H	21.64	-	-	No change	0.532401
Actin	X33	21.24	-	-	No change	0.974468
CA	alpha	38.34	0.00000	1.00000	No change	-
CA	GS115	22.38	0.10727	90674.46333	Up regulated	0.000217
CA	KM71H	24.28	0.16031	135512.67259	Up regulated	0.000123
CA	X33	28.03	0.00905	7650.18303	Up regulated	0.024170

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม CFX Manager™ , alpha a คือ *P. pastoris* ที่รับเฉพาะเวคเตอร์ pPICZ α A เข้าไปในจีโนม



รูปที่ 4. 14 ผลการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญในอาหาร BMMY ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ มีค่ากรด - ด่าง ที่ 6

การตรวจสอบความถูกต้องจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real Time PCR อย่างมีประสิทธิภาพ และ เพื่อตรวจสอบความจำเพาะต่อซีโครปิน เอ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real Time PCR คำนวณค่าจาก quantification cycle (Cq) หลังจากนั้นวิเคราะห์ค่า melting curve พบว่า ปรากฏพีคเดี่ยวของยีนซีโครปิน เอ และ พีคเดี่ยวของยีนแอคติน อย่างชัดเจน แสดงในรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 Melting curve ของยีนซีโครปิน เอ (CA) และ ยีนแอคติน (Actin)

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ด้วยเทคนิค Real Time PCR พบว่า ยีสต์ *P. pastoris* ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ X-33, GS115 และ KM71H นั้น มีระดับการแสดงออกที่สูงที่สุดที่ภาวะดังนี้ คือ ค่ากรด - ด่างที่ 6, อุณหภูมิที่ 30 องซาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกภาวะดังกล่าว ใช้ในการเลี้ยงยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ แล้วนำส่วนใสที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำบริสุทธิ์เพื่อตรวจสอบปริมาณรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ

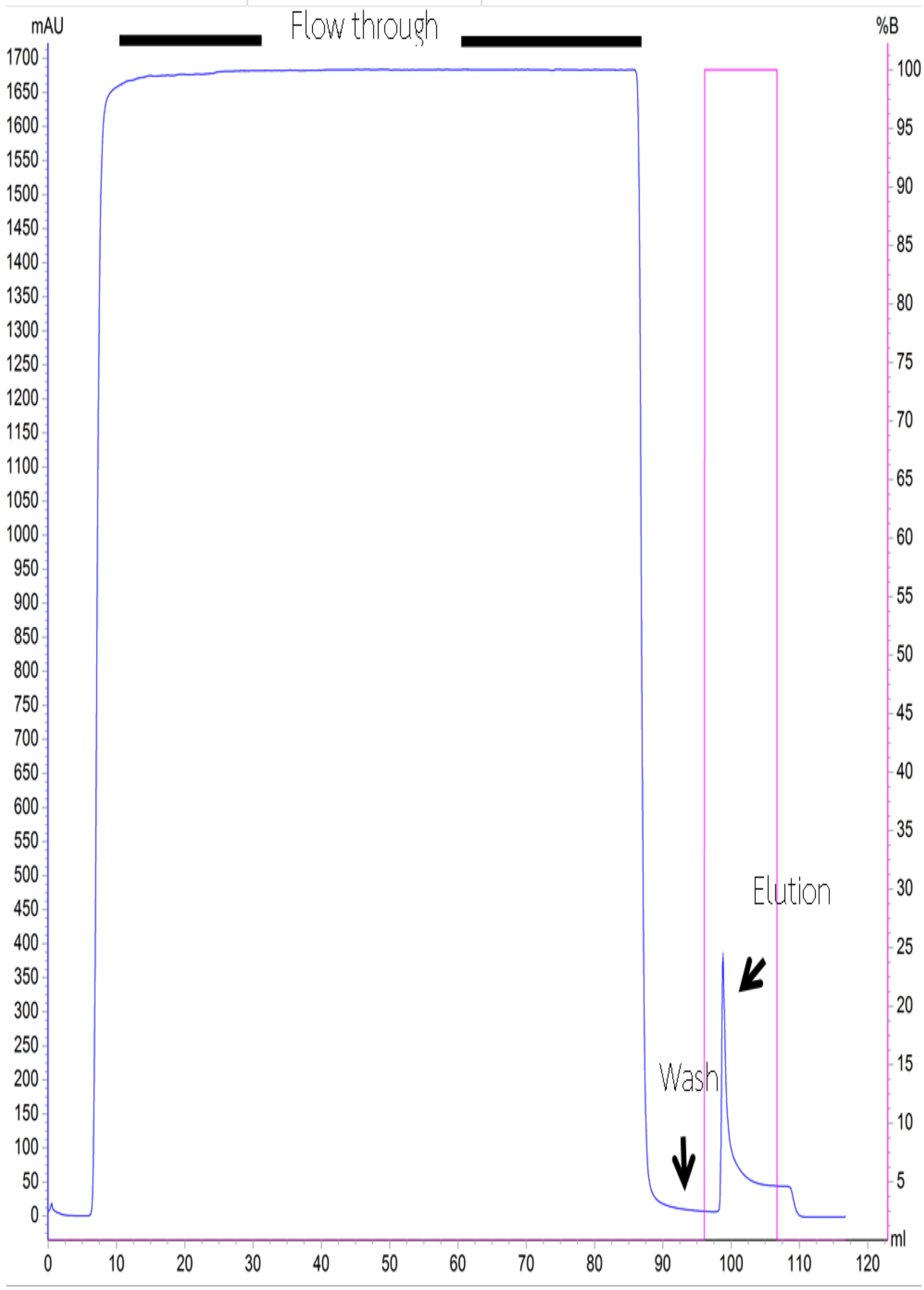
โดยมีรายงานว่า ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพและปริมาณของรีคอมบิแนนต์โปรตีนเป็นอย่างมาก คือ ค่ากรด – ด่าง และ อุณหภูมิ (Jahic et al., 2003a; Jahic et al., 2003b) ซึ่งค่ากรด – ด่าง มีผลต่อกิจกรรมของโปรติเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดนั้นมีความเสถียรที่แตกต่างกันไป ทำให้ค่ากรด – ด่าง ที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนนั้นแตกต่างกันออกไปด้วย และมีรายงานว่า ค่ากรด – ด่าง ที่ยีสต์สามารถผลิตโปรตีนได้ดีนั้นอยู่ระหว่าง 3 ถึง 7 (Jahic et al., 2002) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ค่ากรด – ด่าง ที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ นั้น สามารถผลิตรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ได้ดีที่สุดคือ ค่ากรด - ด่าง ที่ 6 และจากการศึกษาที่ผ่านมา Jin และคณะ รายงานว่า การผลิตรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ จากแมลงหวี่ ในยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 สามารถผลิตได้ดีที่กรด – ด่าง เท่ากับ 6 (Jin et al., 2006)

ส่วนอุณหภูมินั้น มีรายงานว่า อุณหภูมิที่ต่ำนั้นสามารถควบคุมให้มีการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนได้ดีกว่าอุณหภูมิสูง เนื่องจาก การลดอุณหภูมิในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนสามารถช่วยลดการทำงานของโปรติเอส และเพิ่มผลผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนได้ (Dragosits et al., 2009; Jahic et al., 2003a; Jahic et al., 2003b) และอีกทั้ง การเลี้ยงที่อุณหภูมิที่สูงนั้นส่งผลให้มีอัตราการตายของยีสต์ที่เพิ่มสูงขึ้น (Zhong et al., 2014) แต่อย่างไรก็ตาม Adivitiya และคณะ รายงานว่า การเลี้ยง *P. pastoris* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นั้นสามารถผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนได้ดีกว่าอุณหภูมิที่ต่ำ นอกจากนี้ การเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนนั้นมีผลทำให้โปรตีนถูกย่อยสลายไป (Adivitiya et al., 2016) ซึ่งในการผลิตรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ใช้เวลาในการผลิตเป็นเวลาสั้นเพียง 24 ชั่วโมง อีกทั้ง ซีโครปิน เอ เป็นเพปไทด์สายสั้น จึงทำให้คอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ที่ผลิตได้นั้นมีความเสถียรสูง

ยีสต์ *P. pastoris* ในกลุ่มของ Mut^+ มีรายงานว่าสามารถผลิตโปรตีนได้มากที่สุดเนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วในอาหารที่เมทานอลเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากว่า Mut^+ นั้นมียีน *AOX1* ทำให้สามารถใช้เมทานอลในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว (Kim et al., 2009) แต่ทั้งนี้ยังมีรายงานว่า *P. pastoris* กลุ่มของ Mut^S นั้นสามารถผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนได้ดีกว่าในกลุ่มของ Mut^+ (Cregg et al., 1987; Krainer et al., 2012; Orman et al., 2009; Pla et al., 2006) จากการศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ในยีสต์ *P. pastoris* ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ KM71H ที่อยู่ในกลุ่มของ Mut^S นั้นมีระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ที่สูงที่สุด และยังมีปริมาณโปรตีนที่สูงที่สุด ซึ่งสายพันธุ์ KM71H ที่อยู่ในกลุ่มของ Mut^S นั้นมีอัตราการใช้เมทานอลในการเจริญเติบโตอย่างช้า เนื่องจากยีน *AOX1* ถูกกำจัดไม่ให้ใช้งาน แต่ตรงกันข้ามกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่พบว่ามีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ X33 และ GS115 ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ Mut^+ เนื่องจากว่าอัตราการใช้เมทานอลนั้นแปรผันตามการเปลี่ยนเมทานอลไปเป็นพลังงาน เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโต การผลิตโปรตีน และการส่งโปรตีนที่ผลิตได้ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้ยีสต์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ Mut^+ ที่ผลิตรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ได้ออกมาในปริมาณที่น้อยกว่า Mut^S ซึ่งเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นตัวเหนี่ยวนำทำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนเพิ่มมากขึ้น แต่ถ้ามากจนเกินไปเมทานอลจะทำให้เซลล์ตายและมีโปรติเอสมากขึ้นในการผลิต (Daly and Hearn, 2005; Jahic et al., 2003a) ทั้งนี้ความเข้มข้นของเมทานอลที่เพิ่มขึ้นนั้นส่งผลต่อเพอร์อกซิโซม (peroxisome) ทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ เช่น การเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซค์ และ ฟอร์มัลดีไฮด์ ซึ่งส่งผลโดยตรงกับแอลกอฮอร์ออกซิเดส เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวไปยับยั้งการทำงานของแอลกอฮอร์ออกซิเดสและยังไปทำลายโครงสร้างของเซลล์ (Sevella, 2004)

4.2.1 การทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ด้วยคอลัมน์ His trap FF Affinity Chromatography

สำหรับการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ที่ต่อด้วยฮิทธิดีน (his tag) ด้วยคอลัมน์ His trap FF Affinity Chromatography ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่ต่อด้วยฮิทธิดีน (his tag) นั้น ตามข้อ 3.2.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร พบว่า พบพีคในขั้นตอนการชะ ดังรูปที่ 4.16 หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มาพิสูจน์ด้วยวิธีอิมมูโน (dot-blot analysis) โดยใช้ตัวควบคุมเชิงบวก คือ รีคอมบิแนนต์ของชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยวที่ต่อด้วยฮิทธิดีน (Single Chain Variable Fragment : scFv – his tag) และ ตัวควบคุมเชิงลบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ, binding buffer และ elution buffer พบว่า รีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ และ รีคอมบิแนนต์ของชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยวที่ต่อด้วยฮิทธิดีน (Single Chain Variable Fragment : scFv – his tag) ให้ผลเป็นบวกที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ แสดงดังรูปที่ 4.17 หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคอลัมน์นำไปไดอะไลซิส (dialysis) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ค่ากรด – ด่างที่ 7.4 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นผ่านกราฟมาตรฐาน พบว่า ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ X-33, GS115 และ KM71H มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดอยู่ระหว่าง 139.58 ถึง 231.86 ไมโครกรัม ดังตารางที่ 4.11

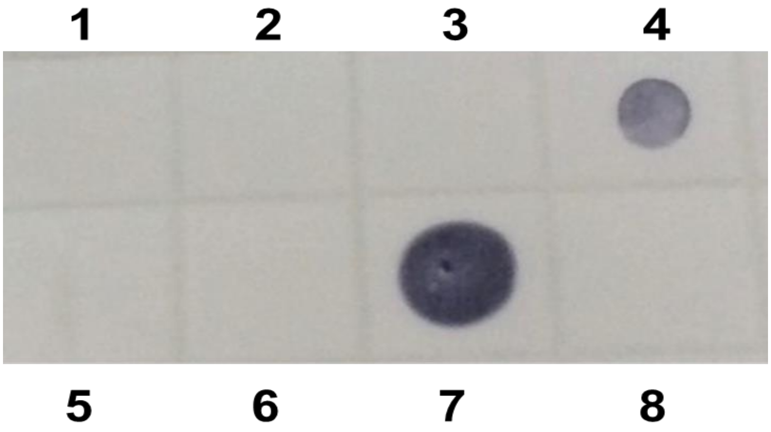


รูปที่ 4.16 โครมาโตแกรมของ affinity chromatography ของการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ด้วยคอลัมน์ฮีสแทรบฟาสท์โฟลว์ (His trap Fast Flow)

4.2.2 การตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการภูมิคุ้มกัน (Dot blot analysis)

การติดตามรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ด้วยหลักการภูมิคุ้มกัน (Dot blot analysis) โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างจากส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ (Supernatant), ตัวอย่างที่ไม่จับกับคอลัมน์ (Flow through) และ ตัวอย่างที่ได้จากการชะจากคอลัมน์ (Elution fraction) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ (BMMY), สารละลาย binding buffer และ สารละลาย elution buffer เป็นตัวควบคุมเชิงลบ และใช้รีคอมบิแนนต์ของชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยวที่ต่อด้วยฮิทธิดีน (Single Chain Variable Fragment : scFv – his tag) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก จากการตรวจวิเคราะห์ (รูปที่ 4.17) ปรากฏจุดสีดำเฉพาะในส่วนของตัวอย่างที่ได้จากการชะจากคอลัมน์ (Elution fraction) ช่องที่ 7 และ ตัวควบคุมเชิงบวก (ช่องที่ 4) แต่ไม่ปรากฏจุดสีดำในช่องที่ 5 ที่เป็นตัวอย่างจากส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ (Supernatant) ก่อนที่จะทำบริสุทธิ์ ทั้งนี้ อาจเป็นปริมาณความเข้มข้นของรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ที่ผลิตได้ มีความเข้มข้นน้อย และ ในอาหารที่ใช้เป็นองค์ประกอบของสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) และ เปปโตน (peptone) ที่มาขัดขวางการจับของแอนติบอดี้ที่มีฮิสธิดีนต่อด้วยฮอร์เซอราดิสเปอร์ออกซิเดส (Anti-His (C - term) - HRP) กับ รีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ แต่เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์จับจำเพาะรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ และ ชะออกด้วย สารละลาย elution buffer ปริมาตรเพียง 2 มิลลิลิตร จึงทำให้สามารถตรวจพบรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ

Chulalongkorn University



รูปที่ 4.17 การตรวจวิเคราะห์ซีโครปิน เอ โดยใช้หลักการภูมิคุ้มกัน (Dot blot analysis)

ช่องที่ 1 : อาหารเลี้ยงเชื้อ (BMMY)

ช่องที่ 2 : Binding buffer

ช่องที่ 3 : Elution buffer

ช่องที่ 4 : ตัวควบคุมเชิงบวก (scFv – his tag)

ช่องที่ 5 : ส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ (Supernatant)

ช่องที่ 6 : ส่วนของ Flow through

ช่องที่ 7 : ส่วนของการชะ (Elution Fraction)

ช่องที่ 8 : blank control

4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic acid assay (BCA)

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อยีสต์ *P. pastoris* 3 สายพันธุ์ ที่ภาวะที่มีระดับการแสดงออกของซีโครปิน เอ ที่สูงที่สุด คือ ค่ากรด-ด่างที่ 6 อุณหภูมิที่ 30 องซาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ และนำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทำบริสุทธิ์ตามวิธีข้อ 3.2.5 และนำตัวอย่างที่ได้จากการชะจากคอลัมน์ (Elution fraction) มาวิเคราะห์ปริมาณรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ KM71H และ GS115 ให้ปริมาณรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ใกล้เคียงกัน ประมาณ 214.67 ถึง 231.86 ไมโครกรัม ต่อ 50 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือ คิดเป็น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์ X33 ซึ่งป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม (wide type) ให้ปริมาณรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ต่ำที่สุด คือ 139.58 ไมโครกรัม ต่อ 50 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือ คิดเป็น 2.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ปริมาณรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ

สายพันธุ์ของ *P. pastoris*	ปริมาตรการชะ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (ไมโครกรัม)
X33	2	69.79	139.58
GS115	2	107.33	214.67
KM71H	2	115.93	231.86

ที่ผ่านมา Jin และคณะ ได้มีการศึกษาการแสดงออกและศึกษาลักษณะของซีโครปินจากแมลงวันใน *P. pastoris* มีรายงานว่า สามารถผลิตรีคอมบิแนนต์ซีโครปินจากแมลงวัน ได้ 2 มิลลิกรัม

ต่อลิตร (Jin et al., 2006) และในปี 2007 Shen และคณะ ได้ทำการศึกษาการแสดงออกและการทำให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนต์เพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ ซีโครปินจากเชื้อ *E. coli* สามารถผลิตรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ได้เท่ากับ 6.8 มิลลิกรัมต่อลิตร (Xu et al., 2007a)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ในยีสต์ *P. pastoris* ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนในยีสต์ *P. pastoris* นั้นมีด้วยกันอยู่หลายปัจจัย เช่น ค่ากรด - ด่างในการเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ และ ระดับความเข้มข้นของเมทานอล เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกศึกษากระบวนการขั้นพื้นฐานในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน

โดยเริ่มจากการสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีนซีโครปิน เอ อยู่บนพาหะดีเอ็นเอ pPICZα A และทำการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าไปสู่ยีสต์ *P. pastoris* 3 สายพันธุ์ ด้วยการส่งถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporator) หลังจากนั้นทำการเลี้ยงและหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโดยทำการวิเคราะห์โปรตีนโดยเจลอิเลคโตรโพรีซีส พบว่า ไม่สามารถพบแถบโปรตีนรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ได้ เนื่องจาก รีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ที่ผลิตได้ มีความเข้มข้นน้อยเกินไปจึงไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโพรีซีสได้ งานวิจัยครั้งนี้จึงใช้เทคนิค Real time PCR เข้ามาช่วยในการศึกษาการแสดงออกของยีนโดย พบว่า สามารถตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ได้ จึงเลือกใช้วิธีนี้เป็นวิธีการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ ของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการแสดงออกที่ดีที่สุดในภาวะ ดังนี้ คือ ค่ากรด - ด่างที่ 6 อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และ ระดับความเข้มข้นของเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของยีนซีโครปิน เอ จากนั้น ทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้คอลัมน์ His tarp FF ซึ่งจำเพาะต่อรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ที่ต่อด้วยฮิทธิดีน และ

ทำการตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ด้วยวิธีอิมมูโน และวิเคราะห์ปริมาณการรีคอมบิแนนต์ซีโครปิน เอ ของ *P. pastoris* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี BCA พบว่า มีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 139.58 ถึง 231.86 ไมโครกรัม ต่อ 50 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Adivitiya, Dagar, V.K., Devi, N., Khasa, Y., 2016. High level production of active streptokinase in *Pichia pastoris* fed-batch culture. *International Journal of Biological Macromolecules* 83, 50-60.

Andreu, D., Rivas, L., 1998. Animal antimicrobial peptides: An overview. *Peptide Science* 47, 415-433.

Baker, M.A., Maloy, W.L., Zasloff, M., Jacob, L.S., 1993. Anticancer fffficacy of magainin 2 and analogue peptides. *Cancer Research* 53, 3052-3057.

Boman, H.G., Wade, D., Boman, I.A., Wåhlin, B., Merrifield, R.B., 1989. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin - melittin hybrids. *Federation of European Biochemical Societies* 259, 103-106.

Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology* 3, 238-250.

Brown, K.L., Hancock, R.E.W., 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology* 18, 24-30.

Çelik, E., Çalık, P., 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* 30, 1108-1118.

Cereghino, J.L., Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Federation of European Microbiological Societies* 24, 45-66.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Chiruvolu, V., Cregg, J.M., Meagher, M.M., 1997. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* 21, 277-283.

Couderc, R., Baratti, J., 1980. Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris* - Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry* 44, 2279-2289.

Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J.Y., Higgins, D.R., 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology* 16, 23-52.

Cregg, J.M., Tschopp, J.F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W.S., Buckholz, R.G., Madden, K.R., Kellaris, P.A., Davis, G.R., 1987. High level expression and efficient assembly of hepatitis-B surface-antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia-Pastoris*. *Biotechnology* 5, 479 - 485.

Daly, R., Hearn, M.T.W., 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition* 18, 119-138.

De Smet, K., Contreras, R., 2005. Human antimicrobial peptides: Defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters* 27, 1337-1347.

Dragosits, M., Stadlmann, J., Albiol, J., Baumann, K., Maurer, M., Gasser, B., Sauer, M., Altmann, F., Ferrer, P., Mattanovich, D., 2009. The effect of temperature on the oroteome of recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of Proteome Research* 8, 1380-1392.

Dürr, U.H.N., Sudheendra, U.S., Ramamoorthy, A., 2006. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758, 1408-1425.

Efimova, S.S., Schagina, L.V., Ostroumova, O.S., 2014. Channel-forming activity of cecropins in lipid bilayers: Effect of agents modifying the membrane dipole potential. *Langmuir* 30, 7884-7892.

Evans, G.A., 1990. Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. Volumes 1, 2, and 3. Current protocols in molecular biology. Volumes 1 and 2. *Cell* 61, 17-18.

Gaspar, D., Veiga, A.S., Castanho, M.A.R.B., 2013. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in Microbiology* 4.

González-Chávez, S.A., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q., 2009. Lactoferrin: Structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33, 301.e301-301.e308.

Guarna, M.M., Lesnicki, G.J., Tam, B.M., Robinson, J., Radziminski, C.Z., Hasenwinkle, D., Boraston, A., Jervis, E., MacGillivray, R.T., Turner, R.F., Kilburn, D.G., 1997. On-line monitoring and control of methanol concentration in shake-flask cultures of *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 56, 279–286.

Guerfal, M., Ryckaert, S., Jacobs, P.P., Ameloot, P., Van C., K., Derycke, R., Callewaert, N., 2010. The HAC1 gene from *Pichia pastoris*: Characterization and effect of

Chulalongkorn University

its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microbial Cell Factories* 9, 1-12.

Guo, C., Huang, Y., Zheng, H., Tang, L., He, J.U.N., Xiang, L., Liu, D., Jiang, H., 2012. Secretion and activity of antimicrobial peptide cecropin D expressed in *Pichia pastoris*. *Experimental and Therapeutic Medicine* 4, 1063-1068.

Habermann, E., 1972. Bee and wasp venoms. *Science* 177, 314-322.

Hancock, R.E.W., Chapple, D.S., 1999. Peptide antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43, 1317-1323.

Higgins, D.R., Cregg, J.M. 1998. Introduction to *Pichia pastoris*, In: Higgins, D.R., Cregg, J.M. (Eds.) *Pichia* protocols. *Humana Press*, Totowa, NJ, 1-15.

Holak, T.A., Engstroem, A., Kraulis, P.J., Lindeberg, G., Bennich, H., Jones, T.A., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., 1988. The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* 27, 7620-7629.

Hoskin, D.W., Ramamoorthy, A., 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 357-375.

Hui, L., Leung, K., Chen, H.M., 2002. The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anticancer agents on leukemia cells. *Anticancer Research* 22, 2811-2816.

Hultmark, D., EngstrÖM, Å., Bennich, H., Kapur, R., Boman, H.G., 1982. Insect Immunity: Isolation and Structure of Cecropin D and Four Minor Antibacterial

Components from *Cecropia Pupae*. *European Journal of Biochemistry* 127, 207-217.

Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H.G., 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry* 106, 7-16.

Hung, S.C., Wang, W., Chan, S.I., Chen, H.M., 1999. Membrane lysis by the antibacterial peptides cecropins B1 and B3: A spin-label electron spin resonance study on phospholipid bilayers. *Biophysical Journal* 77, 3120-3133.

Invitrogen, M., 2005. The EasySelect™ Pichia Expression Kit

Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A.K., Martinelle, M., Enfors, S.O., 2003a. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *Journal of Biotechnology* 102, 45-53.

Jahic, M., Rotticci M., J., Martinelle, M., Hult, K., Enfors, S.O., 2002. Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24, 385-393.

Jahic, M., Wallberg, F., Bollok, M., Garcia, P., Enfors, S.O., 2003b. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microbial Cell Factories* 2, 1-11.

Ji, S., Li, W., Zhang, L., Zhang, Y., Cao, B., 2014. Cecropin A–melittin mutant with improved proteolytic stability and enhanced antimicrobial activity against

bacteria and fungi associated with gastroenteritis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 451, 650-655.

Jin, F., Xu, X., Zhang, W., Gu, D., 2006. Expression and characterization of a housefly cecropin gene in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 49, 39-46.

Katakura, Y., Zhang, W.H., Zhuang, G.Q., Omasa, T., Kishimoto, M., Goto, W., Suga, K.I., 1998. Effect of methanol concentration on the production of human beta (2)-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor Gas Sensor. J. Ferment. Bioeng. 86, 482-487.

Khatri, N.K., Hoffmann, F., 2006. Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 93, 871-879.

Killion, J.J., Dunn, J.D., 1986. Differential cytolysis of murine spleen, bone-marrow and leukemia cells by melittin reveals differences in membrane topography. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 139, 222-227.

Kim, S.J., Lee, J.A., Kim, Y.H., Song, B.K., 2009. Optimization of the functional expression of coprinus cinereus peroxidase in *Pichia pastoris* by varying the host and promoter. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 966-971.

Chulalongkorn University

Krainer, F.W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O., Glieder, A., 2012. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microbial Cell Factories* 11, 1-14.

Lee, J.Y., Boman, A., Sun, C.X., Andersson, M., Jörnvall, H., Mutt, V., Boman, H.G., 1989. Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 86, 9159-9162.

Liu, X., Guo, C., Huang, Y., Zhang, X., Chen, Y., 2015. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by Cecropin D in vitro. *Infection, Genetics and Evolution* 34, 7-16.

Macauley, P.S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249–270.

Mauricio, D., Elena, V., Stefano, M., Gloria, A., Sergio, H.M., 2012. Intein-mediated expression of cecropin in *Escherichia coli*. *Electronic Journal of Biotechnology* 15.

Mayson, B.E., Kilburn, D.G., Zamost, B.L., Raymond, C.K., Lesnicki, G.J., 2003. Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-batch cultures of *Pichia methanolica*. *Biotechnology and Bioengineering* 81, 291-298.

Moore, A.J., Devine, D.A., Bibby, M.C., 1994. Preliminary experimental anticancer activity of cecropins. *Journal of Peptide Research* 7, 265-269.

Chulalongkorn University

Orman, M.A., Calik, P., Ozdamar, T.H., 2009. The influence of carbon sources on recombinant-human-growth-hormone production by *Pichia pastoris* is dependent on phenotype: a comparison of Mut(s) and Mut(+) strains. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 52, 245–255.

Ouyang, L., Xu, X., Freed, S., Gao, Y., Yu, J., Wang, S., Ju, W., Zhang, Y., Jin, F., 2015. Cecropins from *Plutella xylostella* and their interaction with *Metarhizium anisopliae*. *Public library of science (PLOS)* 10, e0142451.

Oyston, P.C.F., Fox, M.A., Richards, S.J., Clark, G.C., 2009. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *Journal of Medical Microbiology* 58, 977-987.

Pla, I.A., Damasceno, L.M., Vannelli, T., Ritter, G., Batt, C.A., Shuler, M.L., 2006. Evaluation of Mut^{+} and Mut^{S} *Pichia pastoris* phenotypes for high level extracellular scFv expression under feedback control of the methanol concentration. *Biotechnology Progress* 22, 881-888.

Pushpanathan, M., Gunasekaran, P., Rajendhran, J., 2013. Antimicrobial peptides: Versatile biological properties. *International Journal of Peptides* 2013, 15.

Riedl, S., Zweytick, D., Lohner, K., 2011. Membrane-active host defense peptides – Challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chemistry and Physics of Lipids* 164, 766-781.

Schweizer, F., 2009. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *European Journal of Pharmacology* 625, 190-194.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Shen, Y., Lao, X.G., Chen, Y., Zhang, H.Z., Xu, X.X., 2007. High-level Expression of Cecropin X in *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences* 8, 478-491.

Shin, S.Y., Lee, M.K., Kim, K.L., Hahm, K.S., 1997. Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *The Journal of Peptide Research* 50, 279-285.

Srisailam, S., Kumar, T.K.S., Arunkumar, A.I., Leung, K.W., Yu, C., Chen, H.M., 2001. Crumpled structure of the custom hydrophobic lytic peptide cecropin B3. *European Journal of Biochemistry* 268, 4278-4284.

Subbalakshmi, C., Sitaram, N., 1998. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *Federation of European Microbiological Societies* 160, 91-96.

Sui, S.F., Wu, H., Guo, Y., Chen, K.S., 1994. Conformational changes of melittin upon insertion into phospholipid monolayer and vesicle. *Journal of Biochemistry* 116, 482-487.

Suttmann, H., Retz, M., Paulsen, F., Harder, J., Zwergel, U., Kamradt, J., Wullich, B., Unteregger, G., Stöckle, M., Lehmann, J., 2008. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *Biomed Central Urology* 8, 1-7.

Chulalongkorn University

Swartz, J.R., Cooney, C.L., 1981. Methanol inhibition in continuous culture of *Hansenula polymorpha*. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 1206-1213.

Téllez, G.A., Castaño-Osorio, J.C., 2014. Expression and purification of an active cecropin-like recombinant protein against multidrug resistance *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 100, 48-53.

Trinh, L.B., Phue, J.N., Shiloach, J., 2003. Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 82, 438-444.

Tryselius, Y., Samakovlis, C., Kimbrell, D.A., Hultmark, D., 1992. CecC, a cecropin gene expressed during metamorphosis in *Drosophila pupae*. *European Journal of Biochemistry* 204, 395-399.

Van Hoek, M., 2014. Antimicrobial peptides in reptiles. *Pharmaceuticals* 7, 723.

Weiss, W., Weiland, F., Görg, A. 2009. Protein detection and quantibation technologies for gel-based proteome analysis, In: Reinders, J., Sickmann, A. (Eds.) *Proteomics: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, 59-82.

Winder, D., Günzburg, W.H., Erfle, V., Salmons, B., 1998 Expression of antimicrobial peptides has an antitumour effect in human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242, 608-612.

Chulalongkorn University

Xia, L., Liu, Z., Ma, J., Sun, S., Yang, J., Zhang, F., 2013. Expression, purification and characterization of cecropin antibacterial peptide from *Bombyx mori* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification* 90, 47-54.

Xu, X., Jin, F., Yu, X., Ji, S., Wang, J., Cheng, H., Wang, C., Zhang, W., 2007a. Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 53, 293-301.

Xu, X., Jin, F., Yu, X., Ren, S., Hu, J., Zhang, W., 2007b. High-level expression of the recombinant hybrid peptide cecropin A (1-8) – magainin 2 (1-12) with an ubiquitin fusion partner in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 55, 175-182.

Zhang, J., Movahedi, A., Xu, J., Wang, M., Wu, X., Xu, C., Yin, T., Zhuge, Q., 2015. In vitro production and antifungal activity of peptide ABP-dHC-cecropin A. *Journal of Biotechnology* 199, 47-54.

Zhong, Y., Yang, L., Guo, Y., Fang, F., Wang, D., Li, R., Jiang, M., Kang, W., Ma, J., Sun, J., Xiao, W., 2014. High-temperature cultivation of recombinant *Pichia pastoris* increases endoplasmic reticulum stress and decreases production of human interleukin-10. *Microbial Cell Factories* 13, 1-10.

สุขสมทิพย์, ม. 2554. การโคลนยีนเบื้องต้น (INTRODUCTORY GENE CLONING) (กรุงเทพฯ, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย).

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Low salt LB

- 1.0 เปอร์เซ็นต์ ทริปโตน
- 0.5 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากกยีสต์
- 0.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
- 2.0 เปอร์เซ็นต์ วุ้นสำหรับเตรียมอาหาร (Solid medium)

ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

- 1.0 เปอร์เซ็นต์ ทริปโตน
- 0.5 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากกยีสต์
- 1.0 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
- 2.0 เปอร์เซ็นต์ วุ้นสำหรับเตรียมอาหาร (Solid medium)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. อาหารที่มีเมทานอลเป็นประกอบ (BMMY)

- 1.0 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากกยีสต์ 7 กรัม
- 2.0 เปอร์เซ็นต์ เปปโตน 14 กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- 1.34 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์ไนโตรเจนเบส *
- 4×10^{-5} เปอร์เซ็นต์ ไบโอติน *
- 0.004 เปอร์เซ็นต์ ฮิสธิดีน *
- 0.5 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล

* ยีสต์ไนโตรเจนเบส, ไบโอติน และ ฮิสธิดีน ละลายในน้ำกลั่นและกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

4.1 10 เท่า ยีสต์ไนโตรเจนเบส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งยีสต์ไนโตรเจนเบส 13.4 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร และกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2 500 เท่า ของ ไบโอติน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่งไบโอติน 10 มิลลิกรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 มิลลิลิตร และกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3 100 เท่า ของ ฮิสธิดีน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งฮิสธิดีน 0.4 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร และกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4 1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4 ถึง 7 ปริมาตร 1 ลิตร

โดยเตรียมสารละลาย ดังต่อไปนี้

4.4.1. สารละลาย ก: ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ชั่ง 174.18 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

4.4.2. สารละลาย ข: โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ชั่ง 136.09 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ตารางที่ ก - 1 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ค่ากรด - ด่าง	สารละลาย ก (มิลลิลิตร)	สารละลาย ข (มิลลิลิตร)
4	4	96
5	8	92
6	12.30	87.70
7	61	39

5. อาหาร Yeast Peptone Dextrose (YPD)

- 1.0 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์
- 2.0 เปอร์เซ็นต์ เปปโตน
- 2.0 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส
- 2.0 เปอร์เซ็นต์ วุ้นสำหรับเตรียมอาหาร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. อาหาร Yeast Peptone Glycerol (YPG)

- 1.0 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากกยีสต์
- 2.0 เปอร์เซ็นต์ เปปโตน
- 1.0 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารละลายเคมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) จากการเตรียม *E. coli*

- แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) (น้ำหนักโมเลกุล = 147.02 กรัม) 14.702 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. เตรียมสารเพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

2.1 สารละลาย I ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- กลูโคส (MW = 198.17 กรัม)

- สารละลายทริสคลอไรด์ (Tris-Cl) (ค่ากรด – ด่างที่ 8.0) (น้ำหนักโมเลกุล = 121. กรัม)

- อีดีทีเอ (EDTA) (ค่ากรด – ด่างที่ 8.0) (น้ำหนักโมเลกุล = 292.25 กรัม)

ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 ด้วยกรดไฮดรอคลอริก ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 สารละลาย II ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

- 0.2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ จาก Stock 2 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

- 1% เปอร์เซ็นต์ เอสดีเอส (SDS) จาก Stock 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เตรียม Stock 2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (น้ำหนักโมเลกุล = 40 กรัม) 4 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เตรียม Stock 10 เปอร์เซ็นต์ เอสดีเอส (SDS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- ชั่งเอสดีเอส (SDS) 28.84 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลาย III ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- ชั่งโพแทสเซียมอะซิเตรท 14.72 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติค 6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 1 โมลาร์ ไดไทโอเทียรทอล (Dithiothreitol) (DTT), สำหรับเตรียมยีสต์เพื่อรับพลาสมิด

- ไดไทโอเทียรทอล (น้ำหนักโมเลกุล = 154.25 กรัม) 0.2314 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1.5 และกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. 1 โมลาร์ เอชอีพีอีเอสบัฟเฟอร์ (HEPES) (ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0), สำหรับเตรียมยีสต์เพื่อรับพลาสมิด

- เอชอีพีอีเอส (น้ำหนักโมเลกุล = 238.30 กรัม) 2.383 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 10 มิลลิลิตร และกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Chulalongkorn University

6. 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (PBS), ค่ากรด-ด่างที่ 7.4

- 200 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, ค่ากรด – ด่างที่ 7.4	1	ลิตร
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	175.2	กรัม
- น้ำกลั่น	18	ลิตร

7. 0.05 เปอร์เซ็นต์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ทวีน หรือ PBST (สำหรับล้างในวิธีอิมมูโน)

- ทวีน 20	0.5	มิลลิลิตร
- 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาลีน (PBS), ค่ากรด - ด่าง 7.4	1	ลิตร

8. 5 เปอร์เซ็นต์ นมผงขาดมันเนยกระจายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (สำหรับบลอคในวิธีอิมมูโน)

- นมผงขาดมันเนย	5	กรัม
- 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาลีน (PBS), ค่ากรด - ด่าง 7.4	100	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

9. 1 โมลาร์ ซอร์บิทอล

- ซอร์บิทอล (น้ำหนักโมเลกุล = 182.18 กรัม)	18.2	กรัม

ปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร และกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. ไดอะมิโนเบนซิดีน (DAB) (สำหรับวิธีอิมมูโน)

- ไดอะมิโนเบนซิดีน (3,3'-Diaminobenzidine) 6 มิลลิกรัม
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่ากรด - ด่าง 7.4 20 มิลลิลิตร
- 30 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน เพอร์ออกไซด์ 20 ไมโครลิตร
- 1 เปอร์เซ็นต์ โคบอลต์คลอไรด์ 50 ไมโครลิตร

ละลายไดอะมิโนเบนซิดีน ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นเติมไฮโดรเจน เพอร์ออกไซด์ และโคบอลต์คลอไรด์ ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ค

ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ค - 1 การวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอของรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่แปรผันค่ากรด - ด่าง 4 ถึง 7

pH	ยีสต์	260	280	260/280	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
pH 4	alpha a	13.804	6.246	2.21	552.16
	X33	13.88	11.55	1.2	555.2
	GS115	19.645	8.118	2.42	785.8
	KM71H	16.107	5.944	2.71	644.28
pH 5	alpha a	5.198	2.513	2.07	207.9
	X33	8.605	4.169	2.06	344.2
	GS115	5.403	2.684	2.01	216.1
	KM71H	9.984	4.715	2.12	399.3
pH 6	alpha a	19.075	9.043	2.11	763
	X33	13.735	6.546	2.1	549.4
	GS115	17.965	8.351	2.15	718.6
	KM71H	5.643	2.671	2.11	225.72
pH 7	alpha a	5.79	2.759	2.1	231.6
	X33	1.209	0.61	1.98	48.36
	GS115	4.733	2.3	2.06	189.32
	KM71H	1.755	0.915	1.91	70.2

ตารางที่ ค - 2 การวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอของรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่แปรผัน อุณหภูมิ 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (^{o}C)	ยีสต์	260	280	260/280	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
25	alpha a	18.498	8.491	2.18	739.9
	X33	12.652	5.797	2.18	506.1
	GS115	13.42	6.236	2.15	536.8
	KM71H	10.514	4.751	2.21	420.6
28	alpha a	12.424	5.717	2.17	479
	X33	19.728	9.113	2.16	789.1
	GS115	13.249	6.252	2.12	533.9
	KM71H	10.558	4.855	2.17	422.3
30	alpha a	7.106	5.001	1.42	284.2
	X33	18.2	8.362	2.18	728
	GS115	12.202	5.673	2.15	488.1
	KM71H	10.954	5.046	2.17	438.2

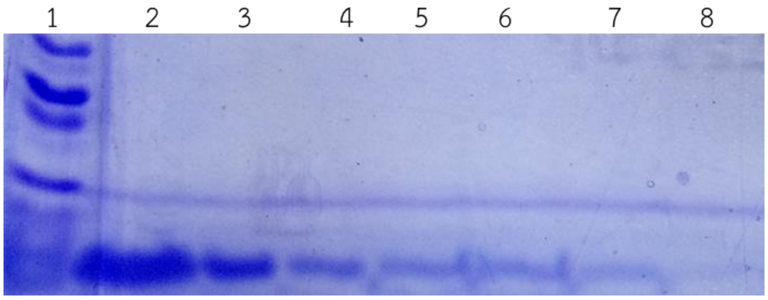
ตารางที่ ค-3 การวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอของรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ที่เจริญในอาหาร BMMY ที่แปรผัน ระดับความเข้มข้นของเมทานอล 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้นของเมทานอล (%)	ยีสต์	260	280	260/280	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
0.5	alpha a	11.73	5.46	2.15	469.2
	GS115	12.16	5.60	2.17	486.5
	KM71H	9.16	4.19	2.19	366.3
	X33	11.38	5.21	2.18	455.2
1	alpha a	10.49	4.89	2.15	419.7
	GS115	12.22	5.60	2.18	488.8
	KM71H	8.77	4.04	2.17	350.8
	X33	22.56	10.41	2.17	902.3
2	alpha a	4.99	2.34	2.13	199.6
	GS115	2.92	1.38	2.12	116.7
	KM71H	3.78	1.77	2.14	151.3
	X33	0.85	0.40	2.14	34

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ซีโครปิน เอ มาตรฐานด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ ง - 1 ผลเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (SDS-PAGE) ของซีโครปิน เอ มาตรฐาน

หมายเหตุ : แถบที่ 1 = ขนาดโมเลกุลมาตรฐาน

แถบที่ 2 = ซีโครปิน เอ มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

แถบที่ 3 = ซีโครปิน เอ มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

แถบที่ 4 = ซีโครปิน เอ มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

แถบที่ 5 = ขนาดโมเลกุลมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

แถบที่ 6 = ซีโครปิน เอ มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

แถบที่ 7 = ซีโครปิน เอ มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.03125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

แถบที่ 8 = ซีโครปิน เอ มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.015625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก จ

การเตรียมโปรตีนมาตรฐานเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน (BSA)

จากตารางที่ จ - 1 ใช้เป็นการเตรียมโปรตีนมาตรฐานโดยทำการเจือจาง จาก stock เซรั่มอัลบูมินจากวัว (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางที่ จ - 1 การเตรียมโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้นที่ 0 ถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

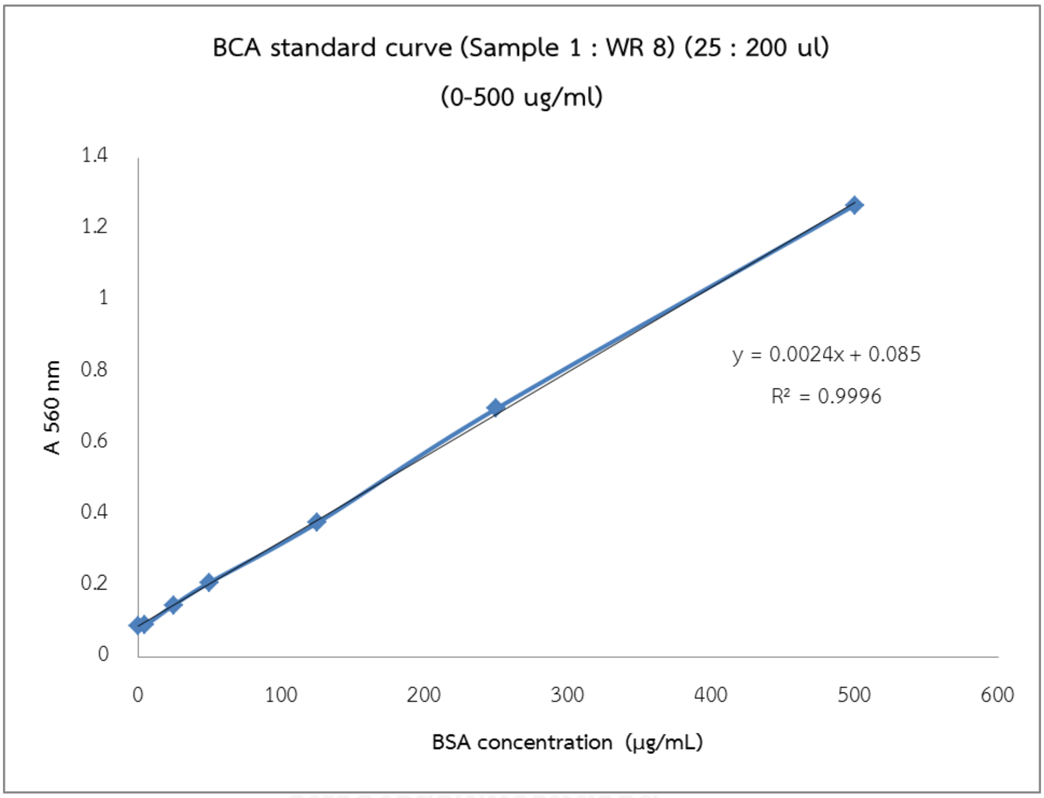
หลอด	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ไมโครลิตร)	ปริมาตรของ BSA (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายของ BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
ก	500	500 *	1000
ข	500	500 จาก ก	500
ค	500	500 จาก ข	250
ง	500	500 จาก ค	125
จ	500	500 จาก ง	50
ฉ	500	500 จาก จ	25
ช	500	500 จาก ฉ	5
ซ	1000	-	0

CHULALONGKORN UNIVERSITY

หมายเหตุ : นำมาจาก stock ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และนำมาเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์

จากนั้นเตรียมสารละลาย A : B (Working reagent : WR) ในอัตราส่วน 50 : 1 เป็นสารละลาย ผสมสารละลาย WR กับสารละลาย Bovine serum albumin ในอัตราส่วน 1 : 8 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560

นาโนเมตร และ ทำกราฟมาตรฐานโปรตีนที่ความเข้มข้น 0 ถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้กราฟมาตรฐานในการคำนวณปริมาณโปรตีนของตัวอย่าง ดังรูปที่ จ - 1



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ จ - 1 กราฟมาตรฐานของเซรั่มอัลบูมินจากวัว

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาว ปรีรญา นามสกุล สิงห์ไข่มุกข์

เกิดเมื่อวันที่ 28 เดือน กันยายน พ.ศ. 2532

ที่อยู่ปัจจุบัน จังหวัดนนทบุรี

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขต จันทบุรี ในปี 2555

ศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2556

ผลงานทางวิชาการ Singkhaimuk, P. Komolpis, K. and Sooksai, S. Effect of host strain on the expression of cecropin A. The International conference on food and applied bioscience. 2016 : Volume: 234-239.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University